

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Certificate of Electronic Filing

I hereby certify that this correspondence is being filed electronically with the  
United States Patent Office under 37CFR 1.8(a) Cert. addressed  
to: Commissioner of Patents Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Catherine M. Kynard

Dated: 

Inventor: Oliver German Perez Martin et al.  
Serial No.: 10/536,778  
Filing Date: 9/21/2005  
Group: 1645  
Examiner: Rodney P. Swartz  
Title: METHOD OF OBTAINING COCHLEAR STRUCTURES,  
VACCINE COMPOSITIONS, ADJUVANTS AND...  
Docket No.: LEXSA.P32  
Customer No: 28752

---

MS: Priority Document  
Commissioner of Patents  
Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

CLAIM OF PRIORITY AND AMENDMENT UNDER  
37 CFR 1.78 35 USC 119 AND/OR 371 AND/OR 37 CFR 1.55(b)

Hon. Sir:

Applicants, through their undersigned attorneys, hereby claim priority under  
35 U.S.C. 119 and enclose a copy of the certified priority document CU 2002-  
0292 filed November 27, 2002, and as filed and received by WIPO on December

12, 2003.

Please enter in the file history of this application.

This now complete applicant's claim of priority under 37 CFR 1.78,  
35 USC 119 and/or 371.

Respectfully submitted,

LACKENBACH SIEGEL, LLP

By: 

Marvin Feldman.  
Reg. No. 25,797

MF:k

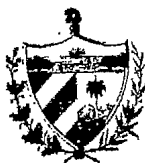
Dated: 

One Chase Road

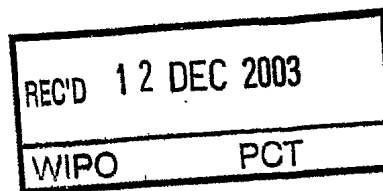
Scarsdale, N.Y. 10583

(914) 723-4300

Enclosure: Priority Document



REPÚBLICA DE CUBA



Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora de la **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**.

**CERTIFICO:** Que bajo el número doscientos noventa y dos del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS COCLEARES. COMPOSICIONES VACUNALES Y ADYUVANTES BASADOS EN ESTRUCTURAS COCLEARES Y SUS INTERMEDIARIOS**, con fecha veintisiete de noviembre de dos mil dos, a las tres horas y cuarenta minutos pasado meridiano, por Sucet Beoto Ramos, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del INSTITUTO FINLAY. CENTRO DE INVESTIGACIÓN-PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS, cuya invención fue creada por Oliver Germán Pérez Martín; Gustavo Rafael Bracho Grandos; Miriam de San Juan Bosco Lastre González; Victoriano Gustavo Sierra González; Concepción Campa Huergo; Nestor Mora González; Ramón Faustino Barberá Morales; Judith Mónica del Campo Alonso; Tamara Rodríguez Ramírez; Caridad Zayas Vignier; Danay Gil Martínez y Carlos Taboada Suárez.

**ASIMISMO CERTIFICO:** Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

**TAMBIEN CERTIFICO:** Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Sucet Beoto Ramos, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los dieciocho días del mes de noviembre de dos mil tres.

  
Ing. María de los Angeles Sánchez Torres  
Directora  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS COCLEARES. COMPOSICIONES  
VACUNALES Y ADYUVANTES BASADOS EN ESTRUCTURAS COCLEARES Y SUS  
INTERMEDIARIOS.

Resumen

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología, específicamente con la rama de los adyuvantes y las vacunas. El objetivo técnico que se persigue es obtener estructuras cocleares a partir de vesículas de membrana externa (ampollas) de microorganismos, con el fin de emplearlas como adyuvantes o como vacunas en sí. La invención también se relaciona con el método de obtención de las estructuras cocleares.

## MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS COCLEARES. COMPOSICIONES VACUNALES Y ADYUVANTES BASADOS EN ESTRUCTURAS COCLEARES Y SUS INTERMEDIARIOS.

5

### Memoria Descriptiva

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología, específicamente con la rama de los adyuvantes y las vacunas.

En la búsqueda de vacunas eficientes, encontrar los antígenos adecuados, ha sido un reto a varias esferas del conocimiento que desbordan la Vaccinología. Después que se cuenta con el antígeno apropiado, este muchas veces no es suficientemente inmunogénico o no induce la respuesta deseada para lo cual es necesario el uso de adyuvantes apropiados. Sigue siendo una necesidad, en estos días, encontrar nuevas vacunas para las enfermedades no protegidas, mejorar las existentes, así como contar con potentes adyuvantes para su uso en vacunas de nueva generación y múltiples. La obtención de vacunas que admitan la inclusión de varios antígenos y que sean efectivas tanto en adultos como en niños, y más aún, en recién nacidos y la búsqueda de adyuvantes funcionales a nivel mucosal con capacidad de resistir el pH ácido del estómago, continúa siendo un reto para los vacunólogos

20

La inmunización mucosal cada día cobra más auge pues muchos microorganismos entran por esta vía. La vía mucosal presenta varias particularidades entre las que se encuentran: la existencia de un sistema mucoso común (capacidad de inducir respuestas locales y a distancia, por aplicación mucosal) y el hecho de que la Ig (inmunoglobulina) A es el principal anticuerpo asociado con su protección.

25

Entre las ventajas de la inmunización mucosal se encuentran su fácil administración, se evita el uso de jeringuillas, menor costo de producción; es menos reactógena y por ello, más segura con respecto a las vacunas parenterales y la inducción de respuestas tanto mucosales como sistémicas.

La inmunización mucosal, sin embargo, tiene que atravesar varias barreras. Entre ellas se encuentran: la acidez del estómago que alcanza pH ácidos extremos; la basicidad del duodeno

y el peristaltismo del tubo digestivo, que junto a lo localizado de los órganos inductores a nivel mucosal con sus células M, especializadas en el muestreo de los antígenos, disminuye la posibilidad de encuentro con los antígenos vacunales. Los cilios y la formación de mucos en los órganos mucosales respiratorios también interfieren con el muestreo de los antígenos vacunales por las células M.

Las estrategias actuales para evitar el contacto del antígeno con un pH ácido son la aplicación de las vacunas en soluciones acuosas bicarbonatadas alejados de los alimentos, para disminuir la acidez del estómago y producir un tránsito rápido por el estómago (Benitez JA *et al.*, Infect and Immun 1999,67(2):539-545) o el recubrimiento del antígeno con agentes resistentes a los ácidos, como puede ser el caso de los liposomas.

En la actualidad son bien conocidos los métodos para preparar liposomas y encapsular materiales liposolubles y sólidos (Schneider U. S. Pat. No. 4, 089, 801, Ash *et al.*, U. S. Pat. No. 4, 448, 765 y Miller *et al.*, U. S. Patent No. 4, 133, 874). Entre los principales problemas que presenta la encapsulación de fármacos en liposomas se encuentran: su poca estabilidad en pruebas de estante; la liberación del material encapsulado; la reducción de la eficacia de las drogas; la susceptibilidad a las condiciones ambientales adversas, la digestión en el tracto gastrointestinal y la no fusión directa con las membranas celulares (<http://www.BDSiAdvantages.html>). Por otra parte, los liposomas son estructuras poco estables y generalmente no pueden ser liofilizados, aspecto éste, que ha sido resuelto por la formación de estructuras cocleares.

Los cocleatos son estructuras multilaminares lipídicas enrolladas sobre sí mismas en formas de caracol. La obtención de cocleatos a partir de la fusión de liposomas unilaminares y empleando cationes divalentes es bien conocido (D. Papahadjopoulos *et al.*, Biochem. Biophys. Acta, 1975; 394:483). Este procedimiento ha sido modificado para la formación de una suspensión de vesículas lipídicas multilaminares conteniendo y rodeadas por el antígeno. Este es convertido en vesículas lipídicas proteicas unilaminares pequeñas por sonicación bajo nitrógeno, para en presencia de iones divalentes formar los cocleatos (Gould-Fogerite *et al.* U. S. Pat. No 5, 643, 574, July 1, 1997). Estos métodos se encuentran resumidos en la Fig. 1.

Los cocleatos y otras microestructuras autoensambladas se han empleado para la administración de agentes terapéuticos (Yager, *et al.* U. S. Pat. No. 5, 851, 536, December 22, 1998, Gould-Fogerite, *et al.* U. S. Pat. No. 5, 994, 318, November 30, 1999 y Yager, *et al.* U. S. Pat. No. 6,180,114, January 30, 2001) incluyendo formulaciones de cocleatos conteniendo  
5 adyuvantes, (Gould-Fogerite, *et al.* U. S. Pat. No. 5, 994, 318, November 30, 1999). No obstante, tanto los liposomas como los cocleatos requieren partir obligatoriamente de lípidos negativos y en ocasiones de colesterol, ambos generalmente de procedencia animal y de alto costo (Mannino, *et al.* U. S. Pat. No 4, 663, 161. May 5, 1987), que cada vez son menos aceptados por las regulaciones farmacéuticas y preferentemente incluyen una proteína  
10 purificada de microorganismos o un péptido para el caso vacunal. Además, vale la pena señalar que el empleo de cocleatos como adyuvantes por sí solos o la inclusión en ellos de otros activadores de señales importantes en la inducción de la respuesta inmune, tales como patrones moleculares asociados a patógenos (estructuras conservadas filogenéticamente para las cuales existen receptores en los hospederos y que son reconocidas como señales de peligro  
15 por la respuesta innata del mismo) no han sido previamente considerados.

El objeto de la presente invención es la obtención de una nueva estructura coclear a partir de vesículas de membrana externa (ampollas) provenientes de organismos vivos, la cual presenta propiedades adyuvantes y vacunales debido a sus características proteicas y lipídicas particulares, así como por los patrones moleculares asociados a patógenos incluidos. Las  
20 estructuras cocleares una vez formadas son homogenizadas en su tamaño para hacerlas más efectivas inmunológicamente.

Las estructuras cocleares de la presente invención se diferencian, en tanto que, a pesar de su composición proteolipídica hasta el momento no ensayado por otros autores, logran autoensamblarse y dar lugar a estructuras enrolladas en sí mismas en forma de caracol. La  
25 composición proteica y lipídica de las estructuras cocleares dependerán del microorganismo de donde procedan las vesículas de membrana externa, es decir, dependerá de las características de las proteínas de su membrana. De igual forma, las mencionadas estructuras contienen concentraciones de patrones moleculares asociados a patógenos, entre el 1-7% en

relación a la concentración de proteínas, provenientes de la membrana del microorganismo en cuestión, insertados y no libres en las mismas. Estos patrones, además pueden ser purificados de otros microorganismos y adicionados para constar con varios patrones en una misma estructura. Los patrones adicionados más los existentes tienen que encontrarse, con respecto a las proteínas, en una relación total entre el 1-30% en relación a la concentración de proteínas. Uno de los patrones moleculares asociados a patógenos incorporados durante la formación de las estructuras cocleares fue el lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* o de *N. meningitidis* (ejemplo 20).

Las estructuras cocleares de la invención permitieron la inducción de una respuesta preferentemente celular y por ello efectiva en lactantes, mostraron propiedades de termo resistencia, así como de ácido y básico resistencia y por tanto fueron efectivos por vía mucosal (ejemplos 2, 4, 6, 8 y 10). Estas propiedades fueron útiles para el diseño de adyuvantes heterólogos (adyuvantes empleados para potenciar vacunas diferentes a las que dieron origen a las vesículas de membrana externa) y vacunas homólogas (vacunas contra el microorganismo de donde provienen las vesículas de membrana externa) empleando las mencionadas estructuras.

Con relación a la composición vacunal ensayada con dicha estructura es importante señalar que las respuestas séricas fueron superiores a las obtenidas empleando la vacuna basada en vesículas de membrana externa adyuvada en alúmina conocida en el mercado, VAMENGOC-BC<sup>®</sup>, en varios tiempos, e indujeron además, IgA específica al ser aplicadas por vía mucosal. Así mismo, las estructuras cocleares estimularon los linfocitos CD8, una parte importante de la respuesta inmune frente a organismos intracelulares.

La acción adyuvante de las estructuras cocleares fue evaluada a través de varios ensayos. Entre ellos se encuentran: la producción de IL12 en la línea histiocitaria humana U937 (ejemplo 11) y la producción de óxido nítrico en la línea macrofágica murina J774, en ausencia de otros estímulos (ejemplos 13); la estimulación de células dendríticas humanas (ejemplo 15) y la reducción de las induraciones de las lesiones del reto con *Leishmania major* en ratones



inmunizados con las estructuras cocleares conteniendo antígenos de este protozoo (ejemplo 16).

Las estructuras cocleares de la invención hacen a la vacuna final o al adyuvante inducir “*in vivo*” respuestas más tempranas, potentes y duraderas, mientras que “*in vitro*” se observa la inducción eficiente de mediadores involucradas con la inducción de un patrón celular y buena estimulación de células presentadoras de antígenos profesionales (células dendríticas) (ejemplos 11, 13 y 15).

Otro objeto de esta invención es el empleo de las vesículas de membrana externa, que constituyen el punto de partida para la obtención de las estructuras cocleares, como vacunas en sí mismas o como adyuvantes heterólogos, de esta manera que la eliminación de la adsorción en hidróxido de aluminio no limite la capacidad inmunogénica de las mismas, considerando que no se ha explorado suficientemente la capacidad de las vesículas de membrana externa por sí solas para inducir respuestas parenterales.

Dichas vesículas se definen como nanoesferas autoensambladas, constituidas por una bicapa lipídica con proteínas y polisacáridos insertados en la misma. Estas pueden extraerse de cualquier patógeno y presentar diferentes patrones moleculares asociados a los mismos (particularmente lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina o lipofosfoglicano). El Lipofosfoglicano y el lipolisacárido fueron obtenidos de *Leishmania major* y *N. meningitidis* o *Salmonella tify*, respectivamente, durante el proceso de obtención de las vesículas de membrana externa donde quedan insertados en las mismas y nunca libres en proporciones entre 1 y 7% del peso proteico.

Como vacuna, las vesículas de membrana externa extraídas de *Salmonella tify* o de *N. Meningitidis* B indujeron respuesta de IgA por vía nasal y buena respuesta inmunológica por vía parenteral. (ejemplos 3, 5, 7, 12 y 14).

La acción adyuvante de las vesículas de membrana externa fue evaluada a través de varios ensayos. Entre ellos se encuentran: la producción de IL12 en la línea hitiocitaria humana

U937 (ejemplos 12) y la producción de óxido nítrico en la línea macrofágica murina J774 en ausencia de otros estímulos (ejemplos 14); la potenciación de la respuesta celular (incremento de IgG2a) por la conjugación de polisacáridos a vesículas de membrana externa de *N.meningitidis* en comparación con su unión a toxoide tetánico (ejemplo 18) y la potenciación de la respuesta de anticuerpos anti polisacárido Vi de *S. tify* por conjugación con vesículas de membrana externa procedente de la misma bacteria (ejemplo 19).

El empleo de estructuras cocleares y vesículas de membrana externa como adyuvantes o vacunas logró inesperadamente la potenciación de la respuesta inmune inducida por dosis previas de vacunas o por contacto con el germen natural. Es importante señalar que estas últimas ocurrieron por vías diferentes con respecto a la empleada para la administración de las estructuras cocleares o vesículas (ejemplo 22).

La invención también incluye el método de obtención de las estructuras cocleares a partir de vesículas de membrana externa de organismos vivos. Para ello se realiza la siguiente secuencia de pasos: En primer lugar se purifica la membrana externa estructurada en forma de vesículas a partir de microorganismos o células vivas, por cualquiera de los métodos bien conocidos por una persona experta. Preferiblemente los métodos revelados en EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 o US 4,271,147, Zollinger *et al.* (J. Clin. Invest. 1979, 63:836-848), Frederikson *et al.* (NIPH Annals 1991, 14:67-80), Sauders *et al.* (Infect. Immun. 1999, 67:113-119), Drabick *et al.* (Vaccine 2000, 18:160-172), WO 01/09350 o EP 885900077.8 y US 5,597,572 son usados. De manera tal que finalmente las vesículas de membrana externa contengan entre un 1% y un 7% de lipopolisacárido completamente insertado en las vesículas. A partir de estas se prepara una solución con una concentración de proteínas totales presentes en la vesícula entre 3 y 6 mg/mL; pero incrementando la concentración de detergente (no iónico) hasta 8-12 veces la concentración de proteínas para la completa disolución de dichas vesículas. Esta solución es posteriormente esterilizada por filtración a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m, donde también se eliminan los agregados de

vesículas de membrana externa no disueltos. Luego se realiza una diálisis rotacional o filtración tangencial. La diálisis se realiza durante 24 h contra una solución que contiene concentraciones adecuadas de un ión multivalente (particularmente,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  en concentraciones entre 2,5 y 6,5 mM) en condiciones tamponadas a pH  $7,4 \pm 0,2$ . Finalmente, a las estructuras cocleares obtenidas se les realiza un tratamiento mecánico (particularmente, sonicación en baño de agua temperada a entre 15 °C y 25°C durante 45 min.) para homogeneizar el tamaño de las partículas.

Esta metodología permite la obtención de estructuras cocleares de forma efectiva y rápida, las cuales contienen múltiples proteínas y lípidos de la membrana externa del microorganismo empleado, así como patrones moleculares asociados a patógenos obtenidos de forma natural. Estas estructuras muestran una elevada estabilidad e inmunogenicidad.

Por otro lado, es posible la incorporación de nuevos antígenos en la mencionada estructura durante su proceso de obtención de forma sencilla y eficiente. Los nuevos antígenos son adicionados a la suspensión de vesículas de membrana externa preparada para la obtención de estas estructuras, luego de incrementar la concentración de detergentes y previo a la adición de los iones multivalentes durante el proceso de diálisis. Entre los antígenos posibles a adicionar se encuentran sacáridos, lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos, conjugados y ácidos nucleicos. Estos tienen que encontrarse en una proporción de 0,2-2,7 µg por cada 3-9 µg de proteínas. Por otro lado es también posible la incorporación de otros patrones moleculares asociados a patógenos para estimular eficientemente la respuesta innata y adquirida, lo que permite su utilización eficiente como adyuvante heterólogo. Particularmente se incluyó lipopolisacárido de *Vibrio cholerae*, amastigotes o promastigotes de *Leishmania mayor*, los que permitieron inducir respuestas celulares y de anticuerpos contra ellos. También, se incorporó DNA plasmídico conteniendo proteína verde fluorescente y se enfrentó a líneas macrofágicas evaluando posteriormente su presencia intracelular por fluorescencia. Particularmente también, se incorporó un alérgeno proveniente a *Dermatophagoides siboney* y se determinó la inducción de respuesta celular contra el mismo (ejemplos 16 y 17).

El empleo de organismos vivos como fuente de materia prima para la obtención de estructuras cocleares no había sido descrito previamente. De igual manera no se conocía el procedimiento

para lograr incorporar en las estructuras cocleares uno o varios patrones moleculares asociados a patógenos como en el caso de la presente invención.

La presente invención será descrita a través de los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplo 1. Obtención de las estructuras cocleares.

- 5 Se partió de las vesículas de membrana externa obtenidas por los métodos descritos en EP 885900077.8 o US 5,597,572. Estas son resuspendidas en solución buffer de Tris-EDTA con 0.5% de desoxicolato de sodio. La concentración de proteínas de la suspensión se determinó usando la metodología de Lowry modificado según Peterson (Analyt. Biochem. 83, 346, 1977). El contenido de fosfolípidos que forman las vesículas fue determinado mediante la
- 10 determinación de fósforo inorgánico (Bartlett, J Biol. Chem. 234, 466, 1959). Tanto la concentración de proteínas como la concentración de fosfolípidos fue empleada para establecer las condiciones óptimas y las cantidades de detergentes necesarios para la formación de las estructuras cocleares. Se preparó una solución con las vesículas ajustada a una concentración final proteica de 5-6 mg/mL en tampón Tris-EDTA conteniendo
- 15 desoxicolato de sodio en una cantidad de 6 a 15 veces la cantidad total de proteínas. Esta solución fue filtrada directamente en el dispositivo de diálisis a través de un filtro con tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m. La diálisis fue realizada por agitación rotacional durante 24 h con cambio continuo y lento del tampón de diálisis. Esta última solución consistió en NaCl 50-150 mM, Imidazol 1-4 mM, HEPES 3-5 mM y CaCl 2-7 mM en H<sub>2</sub>O preparada bajo condiciones de
- 20 esterilidad que fueron conservadas durante todos los pasos. La formación de estructuras cocleares fue comprobada por la formación de un precipitado blanco y posterior observación microscópica tanto óptica como electrónica. La concentración de proteínas y fosfolípidos fue nuevamente estimada y ajustada para los posteriores ensayos. Las propiedades físico-químicas de las proteínas incluidas en las estructuras cocleares fueron chequeadas y comparadas con las
- 25 vesículas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie. Adicionalmente la integridad estructural de estas fue chequeada y comprobada por medio de la metodología de Western Blot (Fig. 2-4).

Ejemplo 2. Respuestas inducidas en ratones por las estructuras cocleares en comparación con la vacuna, VA-MENGOC-BC®.

Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía intramuscular con 12 µg de proteínas por ratón en 2 dosis espaciadas 21 días de VA-MENGOC-BC® o estructuras cocleares. Los animales  
 5 fueron sangrados en los tiempos representados después de la 2<sup>da</sup> dosis y las respuestas séricas de IgG anti vesículas de membrana externa fueron evaluadas por ELISA. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las respuestas inducidas por las estructuras cocleares y la vacuna, siempre a favor del primero, en los tiempos 17, 27 y 180 días después de la 2<sup>da</sup> dosis (Fig. 5).

10 Ejemplo 3. Respuestas inducidas en ratones por las vesículas de membrana externa en comparación con la vacuna, VA-MENGOC-BC®, por vía parenteral.

Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía intramuscular con 12 µg de proteínas por ratón en 2 dosis espaciadas 21 días de VA-MENGOC-BC® o vesículas de membrana externa. Los  
 15 animales fueron sangrados en los tiempos representados después de la 2<sup>da</sup> dosis y las respuestas séricas de IgG anti vesículas fueron evaluadas por ELISA. No se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las respuestas inducidas por las vesículas y la vacuna. Estos resultados apoyan la utilidad de las vesículas de membrana externa como vacunas por sí solas (Fig. 6).

Ejemplo 4. Efectividad de la inmunización nasal (IN) o gástrica (IG) con estructuras cocleares.

20 Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía intranasal (IN) o intragástrica (IG) con 100 ó 12 µg de proteínas por ratón en 2 dosis espaciadas 21 días, respectivamente. Los animales fueron sangrados en los tiempos indicados después de la 2 dosis y las respuestas séricas de IgG anti  
 25 vesículas fueron evaluadas por ELISA. Se indujeron buenas respuesta de IgG anti vesículas de membrana externa con ambas concentraciones de estructuras cocleares por vía IG e IN, lo que implica la inducción de buenas respuestas sistémicas por inoculación mucosal (Fig. 7).

Ejemplo 5. Efectividad de la inmunización nasal (IN) con vesículas de membrana externa.

Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía IN 12 µg de proteínas por ratón en 2 dosis espaciadas 21 días. Los animales fueron sangrados en los tiempos indicados después de la 2

dos y las respuestas séricas de IgG anti vesículas fueron evaluadas por ELISA. Se indujeron buenas respuestas de IgG anti vesículas por vía IN, lo que implica la inducción de buenas respuestas sistémicas por inoculación nasal (Fig. 8).

5 Ejemplo 6. Efectividad de estructuras cocleares aplicados por vía nasal (IN) o gástrica (IG) en inducir IgA en saliva.

Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía IN o IG con 100 ó 12 µg de proteínas por ratón, respectivamente, en 2 dosis espaciadas 21 días. En los animales se tomó la saliva 9 días después de la última dosis y las respuestas de IgA anti vesículas de membrana externa fueron  
10 evaluadas por ELISA. Se indujeron significativas respuestas de IgA anti vesículas por vía IN y un se indujo un ligero pero importante incremento de IgA anti vesículas por vía IG (Fig. 9).

Ejemplo 7. Efectividad de las vesículas de membrana externa aplicados por vía nasal (IN) en inducir IgA en saliva.

Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía IN con 12 µg de proteínas por ratón en 2 dosis  
15 espaciadas 21 días. En los animales se tomó la saliva 9 días después de la última dosis y las respuestas de IgA anti vesículas fueron evaluadas por ELISA. Se indujo significativa respuesta de IgA anti vesículas por vía IN (Fig. 10).

Ejemplo 8. Subclases de IgG anti vesículas de membrana externa en suero inducidas por la inmunización con las estructuras cocleares.

20 Ratones Balb/c fueron inmunizados por las vías intranasal (IN), intragástrica (IG) o intamuscular (IM). IN fue con 100 y el resto con 12 µg de proteínas ratón de estructuras coleares en dos dosis espaciadas 21 días. Se empleó VA-MENGOC-BC® como control positivo IM con 12 µg. Los animales fueron sangrados a los 21 días después de la segunda dosis y los títulos de IgG1 e IgG2a en suero fueron analizados por ELISA. En todos los casos  
25 (excepto en los controles negativos) se indujeron títulos significativos ( $p < 0,05$ ) de IgG2a siendo estos más elevados cuando las estructuras cocleares se administraron por vía nasal. Esto indica la inducción de un patrón de anticuerpos IgG de tipo celular Th1 y sobre todo por vía nasal (Fig. 11).

Ejemplo 9. Subclases de IgG en suero inducidas por la inmunización con las vesículas de membrana externa (VME).

Ratones Balb/c fueron inmunizados por diferentes vías con 12 µg de proteínas por ratón de vesículas de membrana externa, en dos dosis espaciadas 21 días, por vía intranasal (IN) o  
5 intramuscular (IM). Se aplicó la vacuna VA-MENGOC-BC® IM en igual concentración como control positivo. Los animales fueron sangrados a los 21 días después de la segunda dosis y los títulos de IgG1 e IgG2a anti VME en suero fueron analizados por ELISA. En todos los casos se indujeron títulos significativos de IgG2a por las vesículas de membrana externa indicando la inducción de un patrón de anticuerpos IgG de tipo celular Th1. No fue así en los  
10 controles negativos IM o IN. Una total inversión del patrón se observó por vía IN donde casi toda la respuesta fue a base de IgG2a (Fig. 12).

Ejemplo 10. Termo y ácido resistencia de las estructuras cocleares formados a partir de vesículas de membrana externa.

La termo resistencia fue evaluada a través de la exposición a 60 °C por 7 días de las muestras.  
15 La ácido resistencia se evaluó a través de la exposición de las estructuras cocleares a pH 1 por 45 min. Posteriormente, las muestras tratadas y el control fueron empleados para inmunizar ratones Balb/c con 2 dosis de 12 µg de proteínas por ratón cada una, espaciadas 14 días, por vía intramuscular. Los ratones fueron sagrados a los 28 días de iniciado el experimento y los sueros mantenidos individualmente a -20 °C hasta su uso. Como puede observarse no hubo  
20 diferencias significativas ( $p > 0,5$ ) entre las respuestas de IgG anti vesículas de membrana externa inducidas en cada animal y grupo (Fig. 13).

Ejemplo 11. Producción de IL12 por la línea celular U937 estimulada con estructuras cocleares en ausencia de otro estímulo.

Las células U937 fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementados con gentamicina a 50  
25 µg/mL, L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), HEPES [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico ácido]] (15 mM) y con 10% de suero bovino fetal (Sigma). Estas

fueron diferenciadas a macrófagos por tratamiento con PMA (forbol miristato acetato) y se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 24 pozos a razón de  $5 \times 10^5$  células / pozo. Luego de 24 h se les añadió las estructuras cocleares a razón de 250 ng/mL en medio de cultivo. Luego de 24 h de estimulación los sobrenadantes fueron recolectados y se determinó la presencia de IL12 mediante un ELISA de tipo sándwich. Se observó la producción de IL12 por las células U937 estimuladas con las estructuras cocleares (Fig. 14).

Ejemplo 12. Producción de IL12 por la línea celular U937 estimulada con vesículas de membrana externa (VME) en ausencia de otro estímulo.

Las células U937 fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementados con gentamicina a 50  $\mu\text{g/mL}$ , L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), HEPES [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico ácido] (15 mM) y con 10% de suero bovino fetal (Sigma). Estas fueron diferenciadas a macrófagos con tratamiento con PMA (forbol miristato acetato) y se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 24 pozos a razón de  $5 \times 10^5$  células / pozo. Luego de 24 h se les añadió las vesículas de membrana externa a razón de 250 ng/mL en medio de cultivo. Luego de 24 h de estimulación los sobrenadantes fueron ensayados para la presencia de IL12 mediante un ELISA de tipo sándwich. Se observó la producción de IL12 por las células U937 estimuladas con las vesículas de membrana externa (Fig. 15).

Ejemplo 13. Producción de óxido nítrico por la línea macrofágica murina J774 estimuladas con estructuras cocleares en ausencia de otro estímulo.

Las células J774 fueron cultivadas en medio DMEN suplementado con gentamicina a 50  $\mu\text{g/mL}$ , L-glutamina (2 mM), piruvato de Sodio (1 mM), HEPES (15 mM) y con 10% de suero bovino fetal (Sigma), previamente inactivado a 56 °C durante 30 min. Se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos a razón de  $1 \times 10^5$  células / pozo y se incubaron por 24 horas a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, las células adherentes fueron incubadas con 200  $\mu\text{L}$  de DMEN y las estructuras cocleares a 250 ng/mL. Se incluyeron también variantes incubadas con L-NMMA (1  $\mu\text{M}$ ), inhibidor de la ruta de producción del óxido nítrico. A las 24 y 48 h se colectaron los sobrenadantes los cuales fueron analizados para el contenido de nitritos mediante la reacción de Greiss (Rockets, KA *et al.*, Infect. Immun.,



1992, 60:3725-3730). Se observó una significativa producción de óxido nítrico por las células incubadas con las estructuras cocleares. Esta producción fue inhibida empleando el L-NMMA (Fig. 16).

Ejemplo 14. Producción de óxido nítrico por la línea macrofágica murina J774 estimuladas con

5 vesículas de membrana externa (VME) en ausencia de otro estímulo.

Las células J774 fueron cultivadas en DMEN suplementado con gentamicina a 50 µg/mL, L-glutamina (2 mM), piruvato de (1 mM), HEPES (15 mM) y con 10% de suero bovino fetal (Sigma), previamente inactivado a 56 °C durante 30 min. Se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos a razón de  $1 \times 10^5$  células / pozo y se incubaron por 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células adherentes fueron incubadas con 200 µL de DMEN y las vesículas de membrana externa a 250 ng/mL. Se incluyó también variantes incubadas con L-NMMA (1µM), inhibidor de la ruta de producción del óxido nítrico. A las 24 y 48 h se colectaron los sobrenadantes, los cuales fueron analizados para el contenido de nitritos mediante la reacción de Greiss (Rockett, K. A *et al.*, Infect. Immun., 1992, 60:3725-3730). Se observó una significativa producción de óxido nítrico por las células incubadas con las vesículas de membrana externa, superior a la inducida por el LPS empleado como control. Esta producción fue inhibida por el L-NMMA (Fig. 17).

Ejemplo 15. Estimulación de células dendríticas humanas por las estructuras cocleares.

La sangre fue extraída y las células mononucleares periféricas fueron purificadas por ficoll. Las células fueron cultivadas a razón de  $10 \times 10^6$  células por mL en presencia de LPS o estructuras cocleares y se determinó la activación de las células dendríticas por Citometría de Flujo. Como puede observarse en la Fig. 18, se activaron las células dendríticas medido a través de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y se incrementó la expresión de moléculas MHC. Esto demuestra el carácter adyuvante de estas estructuras.

25 Ejemplo 16. Reducción de las induraciones en Balb/c inmunizados con estructuras cocleares conteniendo amastigotes de *Leishmania major* y retados con el mismo protozoo.

La inclusión de amastigotes de *L. major* se realizó incluyendo los antígenos semipurificados en los primeros pasos de formación de las estructuras cocleares. La cantidad de detergentes fue ajustada de acuerdo a la cantidad de proteínas totales y la concentración de proteínas totales fue ajustada para mantenerla en un rango de 5-6 mg/mL. La relación entre proteínas vesiculares y de los nuevos antígenos incluidos fue de 12/1. La formación de las estructuras cocleares fue chequeada por microscopia óptica y electrónica. La inclusión de proteínas de *L. major* fue también verificada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con Azul Coomassie. Ratones Balb/c fueron inmunizados con 12 µg de las estructuras cocleares con 2 dosis espaciadas 21 días por vía intramuscular en la pata de la extremidad posterior izquierda. A los 21 días de la segunda dosis los ratones fueron infectados con  $3 \times 10^6$  promastigotes en la misma extremidad de la inmunización. Los promastigotes fueron obtenidos de la fase estacionaria de cultivos realizados en medio DMEN sobre medio sólido agar-sangre. El volumen de las lesiones fue estimado semanalmente a partir de la 4<sup>ta</sup> semana luego de la infección. Se observó una reducción significativa del tamaño de las lesiones en el grupo inmunizado con las estructuras cocleares conteniendo antígenos de *L. major*. Esto demuestra el carácter adyuvante de esta estructura (Fig. 19).

#### Ejemplo 17. Inclusión de DNA plásmidico con la proteína verde fluorescente.

Plásmidos conteniendo el gen de la proteína verde fluorescente bajo el promotor CMV purificados fueron incluidos en la solución inicial de obtención de las estructuras cocleares siguiendo los mismos pasos de obtención que en el ejemplo 1. La relación plásmido / proteínas vesiculares fue ajustada a 1/100. La inclusión de los plásmidos fue chequeada mediante electroforesis en agarosa al 1% de las estructuras cocleares previamente incubados a 37 °C por 30 min. luego de agregar EDTA hasta 2 mM para provocar la liberación del plásmido del interior de estos. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y fueron observados bajo luz ultravioleta. Sólo se observaron presencia de plásmido en las estructuras cocleares que los contenían luego de ser tratadas con EDTA. Posteriormente se desarrolló un ensayo de transfección en la línea celular J774 con estas estructuras. Luego de 2 h de incubación las estructuras cocleares fueron eliminadas del medio de cultivo. La observación

bajo fluorescencia de las células 24 h más tarde arrojó la presencia de numerosas células con señales fluorescentes en el citoplasma.

Ejemplo 18. Potenciación de respuesta celular por conjugación a vesículas de membrana externa.

- 5 El polisacárido (PsC) del serogrupo C de *Neisseria meningitidis* fue conjugado al toxoide tetánico (TT) o a vesículas de membrana externa (VME) de *N. meningitidis* serogrupo B. Ratones Balb/c fueron inmunizados con 3 dosis intraperitoneales (0, 14 y 28 días) que contenía 10 µg de PsC conjugados. Los animales fueron sangrados antes y a los 42 días de iniciado la inmunización. En el suero se determinaron las respuestas de IgG y sus subclases.
- 10 La mayor respuesta de IgG2a encontrada en el grupo conjugado a vesículas de membrana externa es indicativo de una mejor respuesta celular inducida que cuando se conjugó con toxoide tetánico (TT) (Fig. 20).

Ejemplo 19. Potenciación de respuesta de anticuerpos anti polisacárido Vi por conjugación.

- El polisacárido Vi de *Salmonella tiphy* fue conjugado vesículas de membrana externa (VME)
- 15 de *S. tiphy*. Ratones Balb/c fueron inmunizados con 2 dosis intraperitoneales (0 y 28 días) que contenía 10 µg de Vi. Los animales fueron sangrados antes y a los 42 días. En el suero se determinaron las respuestas de IgG y sus subclases. La conjugación incrementa y positiviza la respuesta contra el Vi y se detecta respuesta de IgG2a (Fig. 21).

Ejemplo 20. Posibilidad de inclusión de diferentes concentraciones de patrones moleculares asociados a patógenos en las estructuras cocleares.

- Para la inclusión en las estructuras cocleares de diferentes concentraciones de patrones moleculares asociados a patógenos se ensayaron diferentes cantidades de LPS de *Neisseria meningitidis* B. Las relaciones LPS / proteínas que se emplearon para la inmunización de los ratones fueron: 0.05/12; 0.5/12; 1/12 y 2/12. La formación de las estructuras cocleares fue
- 25 chequeada por microscopia óptica determinándose la relación 1/12 como la máxima relación en la que se puede incluir el LPS sin afectar la formación de las estructuras cocleares. Cantidades mayores afectan visiblemente la formación de las estructuras conduciendo a la

formación de agregados. Todas las variantes obtenidas fueron inmunizadas en ratones Balb/c con dos dosis, espaciadas 21 días, de 12 µg de proteínas por ratón. Los títulos de IgG anti vesículas de membrana externa (VME) fueron determinados no encontrándose diferencias entre los títulos inducidos por las diferentes variantes, pero garantiza la posibilidad de incorporar diferentes LPS en estas estructura (Fig. 22).

Ejemplo 21. Efectividad del método propuesto para los pasos finales en la producción de las estructuras cocleares.

Estructuras cocleares tratadas por sonicación (Tto) suave en baño de agua durante 45 min. a 20 °C y no tratadas fueron empleadas. Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía intranasal con 100 µg de proteínas por ratón en 2 dosis espaciadas 21 días. En los animales se tomó la saliva 9 días después de la ultima dosis y las respuestas de IgA anti vesículas de membrana externa (VME) fueron evaluadas por ELISA. La repuesta inmunológica fueron significativamente más tempranas u duraderas en los animales inmunizados con las estructuras tratadas según muestra la figura 23.

Ejemplo 22. Respuesta de IgA anti vesículas de membrana externa en suero, saliva y vagina inducida por inmunización parenteral y mucosal de animales, evaluada por ELISA.

Ratones Balb/c fueron inmunizados con 2 ó 3 dosis de vesículas de membrana externa (VME) por vía nasal (IN), 3 dosis de vacuna (VA-MENGOC-BC®) intramuscular (IM) como control y la combinación de 1 dosis de vacuna IM y 2 dosis IN. Cada ratón recibió 12 µg de proteínas en los tiempos 0, 21 y 42. Los sueros fueron tomados a 15 días y la saliva y el fluido vaginal a 9 días de la última dosis. Los resultados fueron evaluados por ELISA. Como puede observarse la inmunización nasal induce ligeros incrementos de IgA a nivel sérico no siendo así por la inmunización IM con la vacuna. La respuesta mucosal fue dependiente del número de dosis, es decir 2 dosis no indujeron y 3 dosis si indujeron respuesta de IgA anti vesículas de membrana externa. Por último 2 dosis nasales si fueron efectivas en animales que recibieron un estímulo (una dosis) IM con vacuna (Fig. 24).

Ejemplo 23. Acción adyuvante de las estructuras cocleares (AFCo1) sobre las proteínas incorporadas en las vesículas de membrana externa (VME).

Ratones Balb/c (n = 7) fueron inmunizados con 2 dosis intramuscularmente de 12.5 µg/ratón de VME, AFCo1 o vacuna (VA-MENGOC-BC®). Los sueros fueron tomados antes y en

varios tiempos posteriores a la última dosis. La respuesta de IgG anti VME fue determinada por ELISA. Como puede observarse en la Fig. 25 la presentación a través de los AFO1 indujo respuesta significativamente superiores a la de las VME y la vacuna. Esta además, continuó elevada a los 180 días cuando las otras descendían significativamente.

5

Ejemplo 24. Capacidad adyuvante de las vesículas de membrana externa (VME) frente a antígenos heteólogos (Ovalbúmina, Ova).

Para determinar la función adyuvante primeramente se incorporó Ovalbúmina (Ova) como antígeno heterólogo. Luego se determinó la presentación a TCD4<sup>+</sup> y finalmente se determinó la respuesta de IgG anti Ova y sus subclases *in vivo*.

Incorporación de Ova en VME. Ova fue incorporada en VME mediante el empleo de detergentes, particularmente desoxicolato, el cual permitió el desensamblaje de su estructura vesicular. La eliminación del detergente y el re-ensamblaje de la estructura en presencia de Ova permitieron su incorporación en las VME. La proporción final de VME:Ova fue de 100:11,2. La estructura vesicular fue comprobada mediante cromatografía de exclusión molecular rindiendo perfiles similares a los de las VME solas. La presencia de Ova fue comprobada por SDS-PAGE y su posterior Western Blot revelado con un policlonal anti-Ova el cual demostró la presencia de una banda correspondiente a Ova dentro del perfil proteico de las VME.

Presentación de Ova incorporada en las VME a TCD4<sup>+</sup> y activación de las mismas: Fue empleado el hibridoma de células T CD4<sup>+</sup> restringidas para MHC clase II específico para el péptidos Ova (257-264). Células Dendríticas (CD) fueron incubadas por 2 h con VME-Ova o Ova soluble y luego co-cultivadas con el hibridoma de células T. Los sobrenadantes fueron colectados luego de 24 h y testados para detectar producción de IL2 a través de la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina por la línea celular CTLL dependiente de IL2. La producción de IL2 brinda una medida de la activación de los hibridomas de células T específicos para péptidos de Ova. La Figura 26 muestra que las CD incubadas con VME-Ova pueden presentar los péptidos de Ova al hibridoma de células T CD4<sup>+</sup>. El hibridoma de células T produjo niveles de IL2 significativamente mayores cuando fue estimulado con CD que habían sido previamente incubadas con VME-Ova en comparación con CD incubadas solo con Ova. Las diferencias significativas entre los niveles de presentación del péptido

específico de Ova en MHC-II por CD incubadas con PL-Ova o Ova fueron determinadas usando la Prueba de comparación múltiple de Duncan con un rango de confianza del 95%. De esta forma, el Proteoliposoma puede liberar antígenos a CD y propiciar una eficiente presentación antigénica a células TCD4<sup>+</sup>.

- 5 Respuesta de IgG anti-Ova en ratones C3H/HeN inmunizados con VME-Ova: Ratones C3H/HeN fueron inmunizados intramuscularmente con dos dosis de 5 mg/ml de VME-Ova o solución salina tamponada de fosfato (SSTF) como control negativo o una dosis de la emulsión Titermax-Ova como control positivo. El adyuvante comercial Titermax (Sigma, UK) fue emulsionado con Ova y administrado siguiendo las indicaciones del proveedor.
- 10 Todos los sueros se obtuvieron 21 días después de la primera dosis y fueron evaluados por ELISA para determinar los niveles de IgG anti-Ova presentes en cada grupo. Altas concentraciones de IgG anti-Ova fueron detectadas en el suero de ratones inmunizados con VME-Ova y que con Titermax-Ova (Fig. 27). Este resultado evidencia la capacidad adyuvante de las VME a través de su habilidad para inducir una respuesta de IgG elevada
- 15 contra el antígeno heterólogo incorporado en su estructura.

Respuesta de subclases IgG anti-Ova en ratones C3H/HeN inmunizados con VME-Ova: La subclase IgG2a es característica del patrón Th1 en murinos. Determinar la composición de subclases de la respuesta IgG evidenciada en ratones C3H/HeN inmunizados con VME-Ova era crucial para esclarecer la capacidad adyuvante de las VME. En ratones C3H/HeN

20 inmunizados con VME-Ova se obtuvo un mayor título de IgG2a que de IgG1 anti-Ova. Sin embargo, en los ratones inmunizados con Titermax-Ova se indujo una mayor respuesta de IgG1 que de IgG2a (Fig. 28). Este resultado evidenció que las VME son capaces de polarizar la respuesta inducida contra el antígeno heterólogo incluido en su estructura hacia un patrón de respuesta Th1.

25

#### Ejemplo 25. Potenciación de la respuesta anti Core y anti Cápside del Virus de la Hepatitis C (VHC) por su incorporación en estructuras cocleares (AFCo1).

Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía intramuscular (IM) en las semanas 0, 3 y 7. Siete grupos, de 10 animales, fueron inmunizados con uno de los siguientes inmunógenos:

- 50 µg del plasmidio pIDKE2 (Dueñas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregón JC, Pérez A, Acosta-Rivero N, Vázquez DM, Martínez G, Viña A, Pichardo D, Morales J. Enhancement of the immune response generated against the hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids. *Biotechnol Appl Biochem.* 2002;35:205-212), contiene la secuencia codificante para los antígenos Core, E1 y E2 del VHC;
- 50 µg de pIDKE2 VHC incorporados en 12 µg de estructuras cocleares (AFCo1);
- 10 µg de proteína Core del VHC, (Alvarez-Obregon JC, Dueñas-Carrera S, Valenzuela C, Morales J. A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. *Vaccine* 2001; 19:3940-3946) comprende los primeros 120 aa de la proteína de la cápsida del VHC;
- 10 µg de proteína Core del VHC incorporados en 12 µg de AFCo1;
- 12 µg de AFCo1;
- 50 µg del plasmidio pAEC-K6 (Herrera AM, Rodriguez EG, Hernandez T, Sandez B y Duarte CA. A family of compact plasmid vectors for DNA immunization in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(2):548-551) que no contiene secuencias codificantes para antígenos del VHC;
- 50 µg de pAEC-K6 incorporados en AFCo1;
- Solución salina.

Los plasmidios y la proteína Core fueron administrados en solución salina. La figura 29 muestra la respuesta de IgG contra la proteína Core, 2 semanas después de la última inmunización. El uso del AFCo1 potenció la respuesta de anticuerpos inducida contra la proteína de la cápsida inducida por el plasmidio pIDKE2 ( $p < 0.01$ ). Adicionalmente, la incorporación de la proteína Core en el AFCo1 indujo niveles de anticuerpos significativamente superiores a los inducidos por la proteína Core sola ( $p < 0.05$ ).

### Ventajas de la solución propuesta:

- 5 1. Las vesículas de membrana externa son extraídas de organismos vivos lo que permite la selección de constituyentes durante el proceso extractivo de las membranas externas, que son la primera barrera de contacto huésped-patógeno, por lo que estos constituyentes tienen amplias posibilidades de ser protectores en animales y humanos;
2. Durante el proceso extractivo es posible la inclusión de otras proteínas de interés ya sean naturales o recombinantes;
- 10 3. Las vesículas de membrana externa extraídas de organismos vivos son más estables que los liposomas formados artificialmente, pudiendo mantenerse por varios meses y hasta años sin alteraciones significativas que afecten la formación de futuras estructuras cocleares;
- 15 4. la preferente inducción de respuesta celular, Th1 en animales y humanos, convierte a estos adyuvantes o vacunas en efectivos, además de en adultos y niños, durante la Lactancia;
- 20 5. la estructura coclear formada es termo resistente, por lo que puede ser una buena opción para resolver los problemas de la cadena de frío de varias vacunas, por su formulación en este adyuvante o su desarrollo a partir de vesículas de membrana externa y estructuras cocleares;
6. la estructura coclear formada es ácido y básico resistentes, por lo que es una opción importante a tener en cuenta en las vacunas orales;
7. los antígenos son incorporados durante el proceso productivo, lo que hace al producto final termo resistente, acidorresistente y básico resistente;
- 25 8. la versatilidad de antígenos a incluir, solubles y particulados, incluyendo ácidos nucleicos, permite producir gran número de vacunas e incluso ser múltiples;



9. contiene patrones moleculares asociados a patógenos y se les pueden incorporar otros a voluntad para incrementar su poder adyuvante e inmunogénico, logrando reducir la posible toxicidad de algunos de estos patrones y por ello su respuesta inflamatoria;
- 5 10. estas estructuras cocleares logran inducir respuestas mas tempranas, potentes y duraderas *in vivo*;
11. estas estructuras cocleares logran inducir, *in vitro*, mejores respuestas a nivel de citocinas inductoras de patrones de respuesta inmune celulares;
- 10 12. conserva las propiedades de los cocleatos artificiales (eficiente incorporación de antígenos hidrofóbicos, sistema de liberación lenta, contenido de calcio como mineral esencial, reducción de oxidación lipídica, liofilización, etc.); pero supera a estos en inmunogenicidad, por la inclusión de patrones moleculares asociados a patógenos y su capacidad de inducción de un patrón Th1, incluyendo la inducción de respuesta T citotóxica y
- 15 se evita la procedencia de animales superiores de los lípidos y colesterol.

### Breve descripción de las figuras

- Figura 1. Métodos para la producción de cocleatos descrito en Gould-Fogerite et al. U. S. Pat. No 5,643,574, July 1, 1997.
- 20 Figura 2. Método simplificado de la forma de obtención de las estructuras cocleares objetos de la presente invención.
- Figura 3. Microscopia electrónica de una estructura coclear.
- Figura 4. A, electroforesis en gel de acrilamida al 12.5% teñida con Azul Coomassie de las proteínas presentes en las vesículas de membrana externa y las estructuras cocleares y B,
- 25 Western Blot de las proteínas presentes en las vesículas de membrana externa y las estructuras cocleares usando un suero humano de alto titulo contra las vesículas de membrana externa.

Figura 5. Respuestas séricas de IgG anti vesículas de membrana externa en ratones inmunizados por vía parenteral con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> o con estructuras cocleares evaluados por ELISA.

Figura 6. Respuestas séricas de IgG anti vesículas de membrana externa (VME) en ratones  
5 inmunizados por vía intramuscular con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> o vesículas de membrana externa evaluados por ELISA.

Figura 7. Respuestas séricas de IgG anti vesículas de membrana externa (VME) en ratones inmunizados por vía intragástrica (IG) o intranasal (IN) con vesículas de membrana externa evaluados por ELISA.

10 Figura 8. Respuestas séricas de IgG anti vesículas de membrana externa (VME) en ratones inmunizados por vía intranasal (IN) con vesículas de membrana externa evaluados por ELISA.

Figura 9. Respuesta en saliva de IgA anti vesículas de membrana externa en ratones inmunizados por vía intragástrica (IG) o intranasal (IN) con estructuras cocleares evaluados  
15 por ELISA.

Figura 10. Respuesta en saliva de IgA anti vesículas de membrana externa en ratones inmunizados por vía intranasal (IN) con vesículas de membrana externa evaluados por ELISA.

Figura 11. Resultados en suero de las subclases de IgG anti vesículas de membrana externa de  
20 animales inmunizados con estructuras cocleares evaluados por ELISA.

Figura 12. Resultados en suero de las subclases de IgG anti externa de animales inmunizados con vesículas de membrana externa evaluados por ELISA.

Figura 13. Resultados en suero de la termo resistencia y la acidoresistencia de las estructuras cocleares evaluados por ELISA. Figura 14. Evaluación de la producción de IL12 por las  
25 células U937 estimuladas con las estructuras cocleares.

Figura 15. Evaluación de la producción de IL12 por las células U937 estimuladas con vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

Figura 16. Producción de óxido nítrico por las células J774 incubadas con las estructuras cocleares.

Figura 17. Producción de óxido nítrico por las células J774 incubadas con las vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

5 Figura 18. Estimulación de células dendríticas humanas por estructuras cocleares.

Figura 19. Resultados de las inmunizaciones de animales inmunizados con estructuras cocleares conteniendo amastigotes y retados con *Leishmanais major*.

Figura 20. Resultados del efecto adyuvante de la conjugación de polisacárido con vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

10 Figura 21. Resultados del efecto adyuvante de la conjugación de polisacárido con vesículas de membrana externa de *Salmonella tiphy*.

Figura 22. Resultados de la incorporación de patrones moleculares asociados a patógenos

Figura 23. Resultados del efecto de la sonicación sobre la respuesta inducida por las estructuras cocleares.

15 Figura 24. Resultados de la potenciación de la vía nasal por estímulo inicial intramuscular.

Figura 25. Cinética de respuesta de IgG anti VME potenciada por las estructuras cocleares (AFCo1). La respuesta de IgG anti VME fue determinada en el suero de animales inmunizados por vía intramuscular con VME, VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> o AFCo1. Como puede apreciarse el AFCo1 indujo respuestas significativamente superiores y más duraderas.

20

Figura 26. Células dendríticas (CD) pueden procesar péptidos de Ova incluidos en las vesículas de membrana externa (VME) (VME-Ova) y presentarlos en MHC-II. La producción de IL-2 por el hibridoma de células TCD4<sup>+</sup> fue cuantificada por incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina por la línea celular CTLL dependiente de IL-2. Los datos se presentan como la media  
25 ± la desviación estándar de tres experimentos diferentes. \*significativamente diferente de otros grupos.

Figura 27. Respuesta de IgG anti-Ova en ratones inmunizados con VME-Ova. Ratones C3H/HeN fueron inmunizados con dos dosis de VME-Ova 5 mg/ml, solución salina tamponada de fosfato o con la emulsión Titermax-Ova (control positivo). Los sueros fueron colectados 21 días luego de la primera inmunización y evaluados por ELISA. Los datos muestran la concentración de IgG promedio de cinco animales en cada grupo  $\pm$  la desviación estándar y son representativos de tres ensayos diferentes.

Figura 28. Respuesta de subclases de IgG anti-Ova en ratones inmunizados con VME-Ova. Ratones C3H/HeN fueron inmunizados con dos dosis de VME-Ova 5 mg/ml, solución salina tamponada de fosfato o con la emulsión Titermax-Ova (control positivo). Los sueros fueron colectados 21 días luego de la primera inmunización y evaluados por ELISA. Los datos muestran el título de IgG1 y de IgG2a de las mezclas del suero de cinco animales en cada grupo y son representativos de tres ensayos diferentes.

Figura 29. Respuesta de IgG contra la proteína Core del Virus de Hepatitis C (VHC) inducida por inmunización intramuscular de animales, evaluada por ELISA. La respuesta de IgG anti Core fue determinada en el suero de animales inmunizados por vía intramuscular con tres dosis (semanas 0, 3 y 7) y sangrados dos semanas posteriores a la última dosis. Como puede apreciarse la incorporación de los dos antígenos (Core y Cápside) en AFCo1 indujo respuestas significativamente superiores.

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS COCLEARES. COMPOSICIONES  
VACUNALES Y ADYUVANTES BASADOS EN ESTRUCTURAS COCLEARES Y SUS  
INTERMEDIARIOS.

5

## Reivindicaciones

10

1. Composición vacunal caracterizada porque comprende estructuras cocleares proteolipídicas obtenidas a partir de vesículas de membrana externa de organismos vivos y opcionalmente uno o más antígenos, así como un excipiente adecuado.
2. Composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque dichas estructuras cocleares estén formadas por proteínas, lípidos y patrones moleculares asociados a patógenos.
3. Composición vacunal según la reivindicación 2, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos se encuentran o sean adicionados entre el 1% y el 30% del peso proteico de la estructura coclear.
- 15 4. Composición vacunal según reivindicación 3, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos son seleccionados del grupo consistente en lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina y lipofosfoglicano.
- 20 5. Composición vacunal según reivindicación 1, caracterizada porque el organismo vivo de donde se extraen las vesículas de la membrana externa a partir de las cuales se forman las estructuras cocleares sea una bacteria, un protozooario o una célula animal.
6. Composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizada porque dicha bacteria puede ser Gram negativa o Gram positiva.
- 25 7. Composición vacunal según reivindicación 6, caracterizada porque dicha bacteria Gram negativa sea de los géneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomona* o *Shigella*.

8. Composición vacunal según la reivindicación 6, caracterizada porque dicha bacteria Gram positiva sea de los géneros *Streptococcus* o *Staphylococcus*.
9. Composición vacunal según reivindicación 5, caracterizada porque el organismo vivo sea el protozoo del género *Leishmania*.
- 5 10. Composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizado porque las estructuras cocleares provienen de una célula tumoral.
11. Composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque los antígenos a incluir adicionalmente se encuentran con respecto a las proteínas presentes en la estructura coclear en una relación entre 0,2-2,7  $\mu\text{g}$  por cada 3-9  $\mu\text{g}$  de proteína.
- 10 12. Composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque los antígenos a incluir adicionalmente son seleccionados del grupo consistente en: proteínas naturales o recombinantes, péptidos, sacáridos, ácidos nucleicos; conjugados o alérgenos.
13. Composición vacunal según la reivindicación 12, caracterizada porque el antígeno adicionado sean proteínas del virus de la hepatitis C.
- 15 14. Composición vacunal según la reivindicación 12, caracterizada porque el antígeno adicionado sean epítopes T o B
15. Adyuvante vacunal caracterizado porque comprende estructuras cocleares proteolipídicas obtenidas a partir de vesículas de membrana externa de organismos vivos.
- 20 16. Adyuvante vacunal según la reivindicación 15, caracterizada porque dichas estructuras cocleares están formadas por proteínas, lípidos y patrones moleculares asociados a patógenos.

17. Adyuvante vacunal según la reivindicación 16, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos se encuentran entre el 1% y el 30% del peso proteico de la estructura.
18. Adyuvante vacunal según reivindicación 16, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos son seleccionados del grupo consistente en lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina y lipofosfoglicano.
19. Adyuvante vacunal según reivindicación 15, caracterizada porque el organismo vivo de donde se extraen las vesículas de la membrana externa a partir de las cuales se forman las estructuras cocleares es una bacteria, un protozoario o una célula animal.
20. Adyuvante vacunal según la reivindicación 19 caracterizada porque dicha bacteria sea Gram negativa o Gram positiva.
21. Adyuvante vacunal según reivindicación 20, caracterizada porque dicha bacteria Gram negativa es de los géneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomona* o *Shigella*.
22. Adyuvante vacunal según la reivindicación 20, caracterizada porque dicha bacteria Gram positiva es de los géneros *Streptococcus* o *Staphylococcus*.
23. Adyuvante vacunal según reivindicación 19, caracterizada porque el organismo vivo sea el protozoo del género *Leishmania*.
24. Adyuvante según reivindicación 19, caracterizado porque las estructuras cocleares provienen de una célula tumoral.
25. Composición vacunal caracterizada porque comprende vesículas de membrana externa obtenidas a partir de organismos vivos y opcionalmente uno o más antígenos, así como un excipiente adecuado.

26. Composición vacunal según la reivindicación 25, caracterizada porque dichas vesículas de membrana externa están formadas por proteínas, lípidos y patrones moleculares asociados a patógenos.
27. Composición vacunal según la reivindicación 26, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos se encuentran entre el 1% y el 7% del peso de proteico de la estructura.
28. Composición vacunal según reivindicación 26, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos son seleccionados del grupo consistente en lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina y lipofosfoglicano.
29. Composición vacunal según reivindicación 25, caracterizada porque el organismo vivo de donde se extraen las vesículas de la membrana externa es una bacteria, un protozooario o una célula animal.
30. Composición vacunal según la reivindicación 29, caracterizada porque dicha bacteria puede ser Gram negativa o Gram positiva.
31. Composición vacunal según reivindicación 30, caracterizada porque dicha bacteria Gram negativa es de los géneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomona* o *Shigella*.
32. Composición vacunal según la reivindicación 29, caracterizada porque dicha bacteria Gram positiva es de los géneros *Streptococcus* o *Staphylococcus*.
33. Composición vacunal según reivindicación 29, caracterizada porque el organismo vivo es el protozoo del género *Leishmania*.
34. Composición vacunal según la reivindicación 29, caracterizado porque las vesículas de membrana externa provienen de una célula tumoral.



35. Adyuvante vacunal caracterizado porque comprende vesículas de membrana externa obtenidas a partir de organismos vivos.

36. Adyuvante vacunal según la reivindicación 35, caracterizada porque dichas vesículas de membrana externa están formadas por proteínas, lípidos y patrones moleculares asociados a patógenos.

37. Adyuvante vacunal según la reivindicación 36, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos se encuentran entre el 1% y el 7% del peso de proteico de la estructura.

38. Adyuvante vacunal según reivindicación 36, caracterizada porque los patrones moleculares asociados a patógenos son seleccionados del grupo consistente en lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina y lipofosfoglicano.

39. Adyuvante vacunal según reivindicación 35, caracterizada porque el organismo vivo de donde se extraen las vesículas de la membrana externa es una bacteria, un protozoario o una célula animal.

40. Adyuvante vacunal según la reivindicación 39, caracterizada porque dicha bacteria sea Gram negativa o Gram positiva.

41. Adyuvante vacunal según reivindicación 40, caracterizada porque dicha bacteria Gram negativa sea de los géneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomona* o *Shigella*.

42. Adyuvante vacunal según la reivindicación 40, caracterizada porque dicha bacteria Gram positiva sea de los géneros *Streptococcus* o *Staphylococcus*.

43. Adyuvante vacunal según reivindicación 39, caracterizada porque el organismo vivo es el protozoo del género *Leishmania*.

44. Adyuvante según reivindicación 39, caracterizado porque las vesículas de membrana externa provienen de una célula tumoral.

45. Método para la obtención de estructuras cocleares a partir de vesículas de membrana externa de organismos vivos caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- 5 a. preparación, a partir de las vesículas de membrana externa naturales, de una solución a una concentración de proteínas totales entre 3 y 6 mg/mL, a la que se le añade un detergente no iónico hasta alcanzar una relación de 10 veces la concentración de proteínas.
- 10 b. de desear incorporar otros antígenos de interés o patrones moleculares asociados a patógenos estos se añaden a la solución preparada en a) homogenizando la misma a razón de 0,2-2,7  $\mu$ g por cada 3-9  $\mu$ g de proteína para los antígenos y de 1 a 30% la concentración proteica para los patrones.
- 15 c. posteriormente, la solución de los pasos a) ó b) se filtra a través de una membrana con tamaño de poro de 0.2  $\mu$ m para esterilizarla y eliminar los agregados de vesículas de membrana externa no disueltos.
- d. posteriormente, se realiza una diálisis rotacional o filtración tangencial contra una solución que contiene concentraciones de un ión multivalente, particularmente,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , entre 2,5 y 6,5 mM en condiciones tamponadas de pH  $7,4 \pm 0,2$ .
- 20 e. finalmente, a las estructuras cocleares obtenidas se les realiza un tratamiento mecánico, particularmente, sonicación en baño de agua temperada a una temperatura entre 15 °C y 25°C durante 45 min., para homogeneizar el tamaño de las partículas.

25 46. Composición vacunal según reivindicaciones de la 1 a la 14, caracterizada porque es aplicada por vía mucosal, parenteral o combinación de las mismas.

47. Composición vacunal de las reivindicaciones de la 26 a la 34, caracterizada porque es aplicada por vía mucosal, parenteral o combinación de las mismas.

48. Adyuvante de las reivindicaciones de la 15 a la 24, caracterizado porque es aplicado por vía mucosal, parenteral o combinación de las mismas.

49. Adyuvante de las reivindicaciones de la 35 a la 44 caracterizado, porque es aplicado por vía mucosal, parenteral o combinación de las mismas.

5

10

15

20

25

Fig. 1.

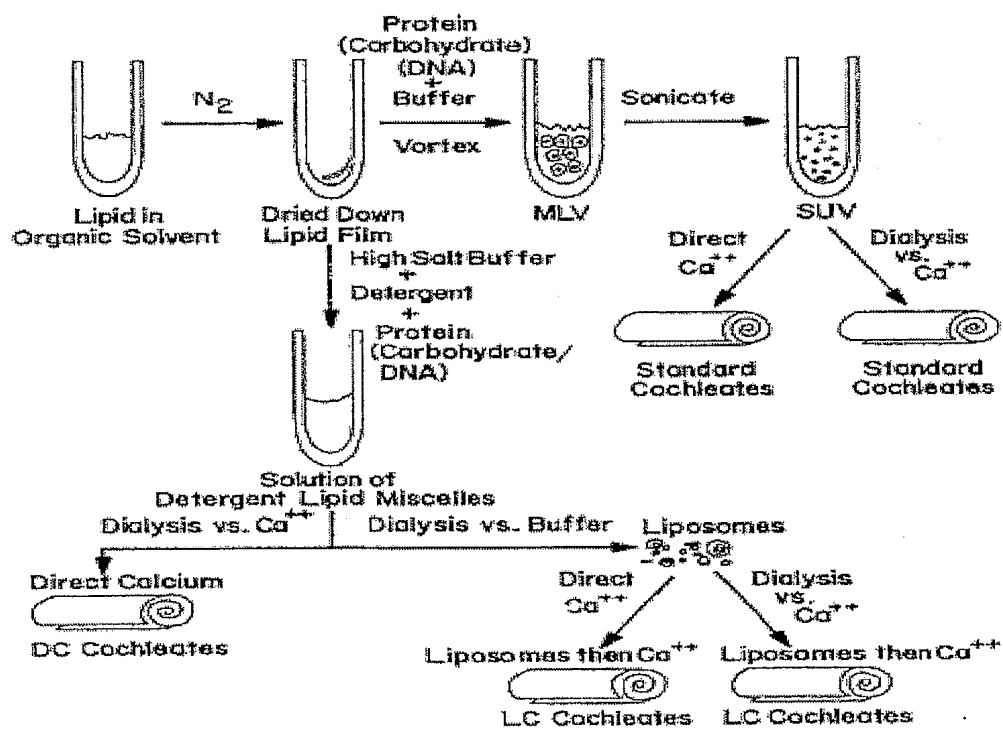


Fig. 2.

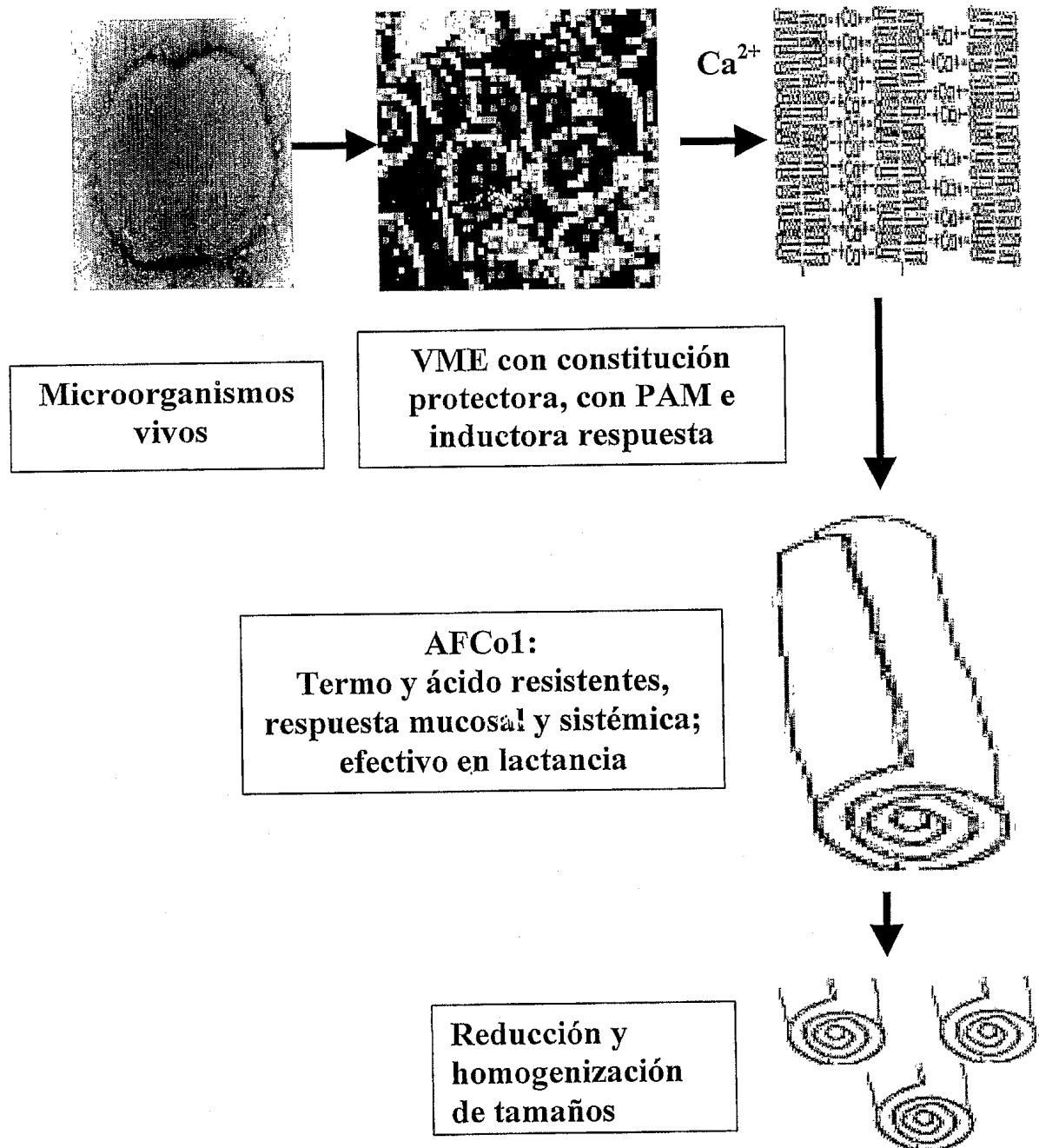


Fig. 3.

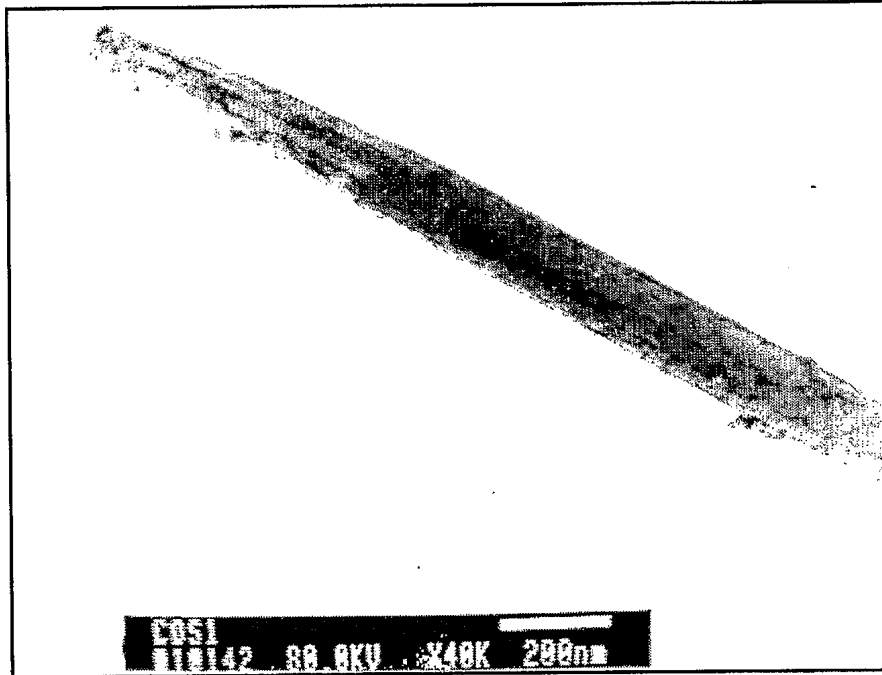
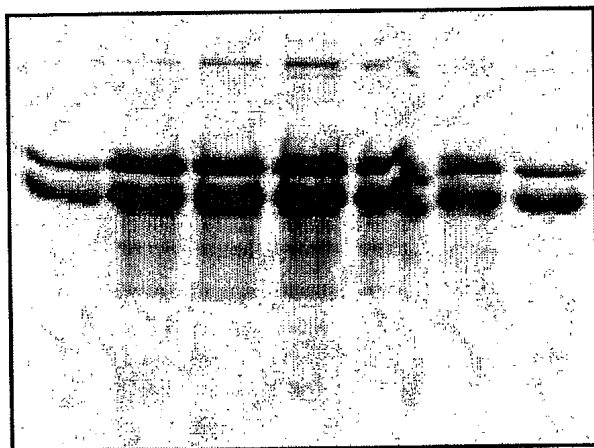


Fig. 4.

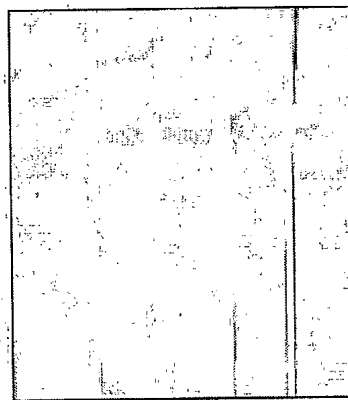
A



A: SDS-PAGE

1, 5 y 7 vesículas de membrana externa  
2-4 y 6 Cocletos

B



B: Western blot, reconocimiento de proteínas por suero de alto título de IgG contra proteínas de *N. meningitidis* B. Estructuras cocleares (1 y 5, vesículas de membrana externa, 2-4 Coleatos).

Fig. 5

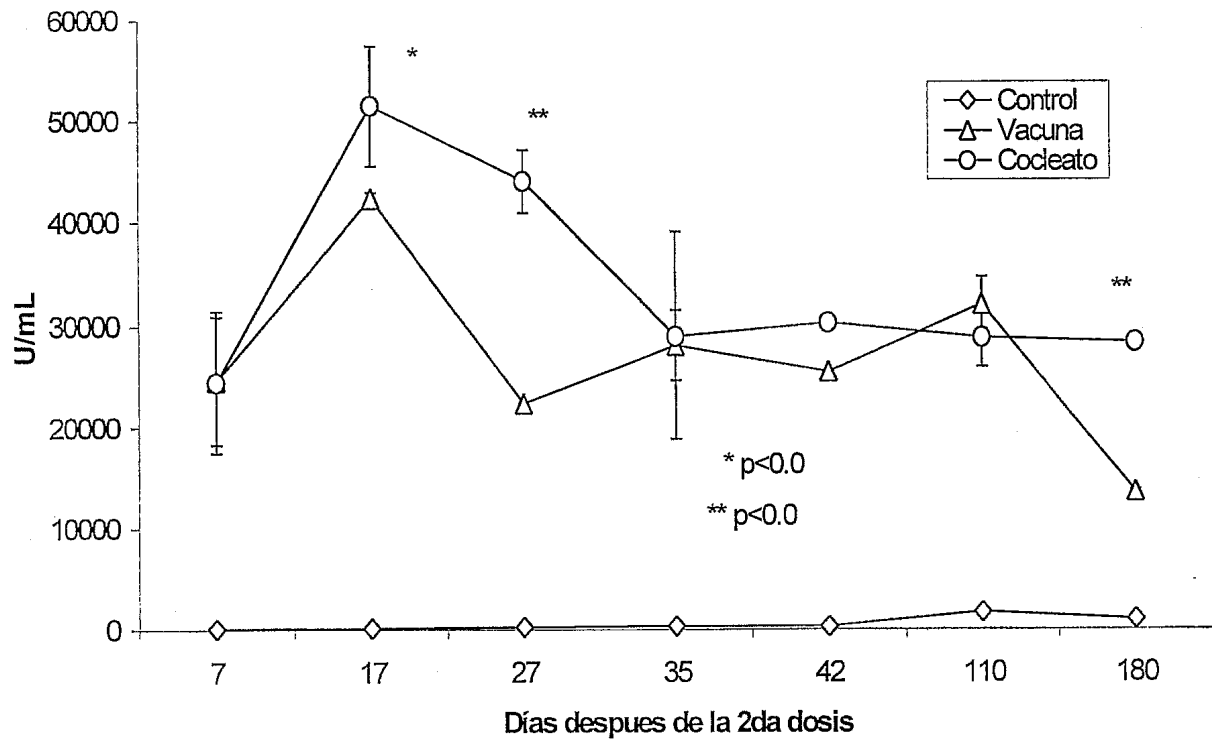




Fig. 6.

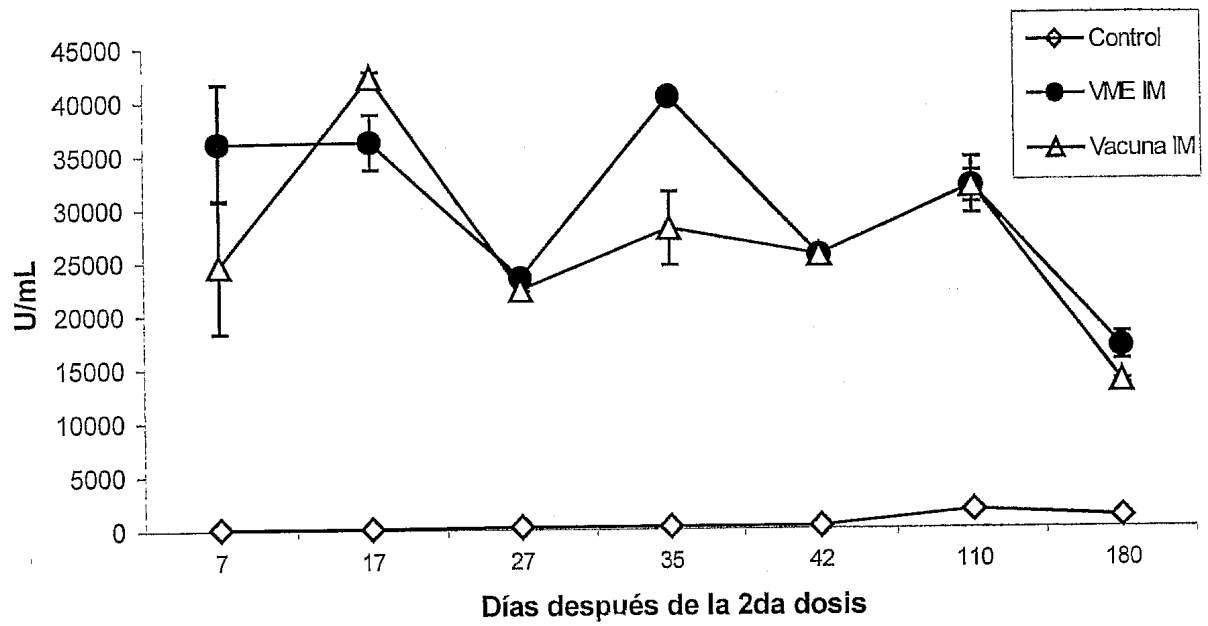


Fig. 7.

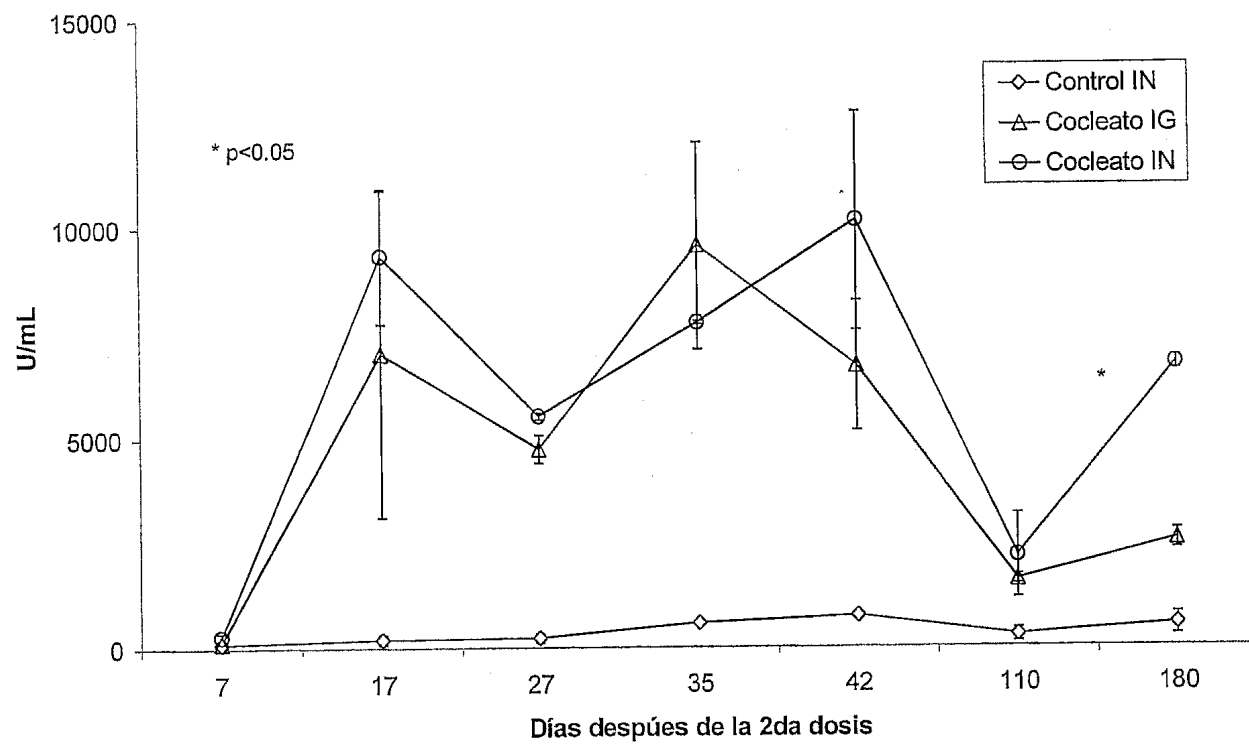


Fig. 8.

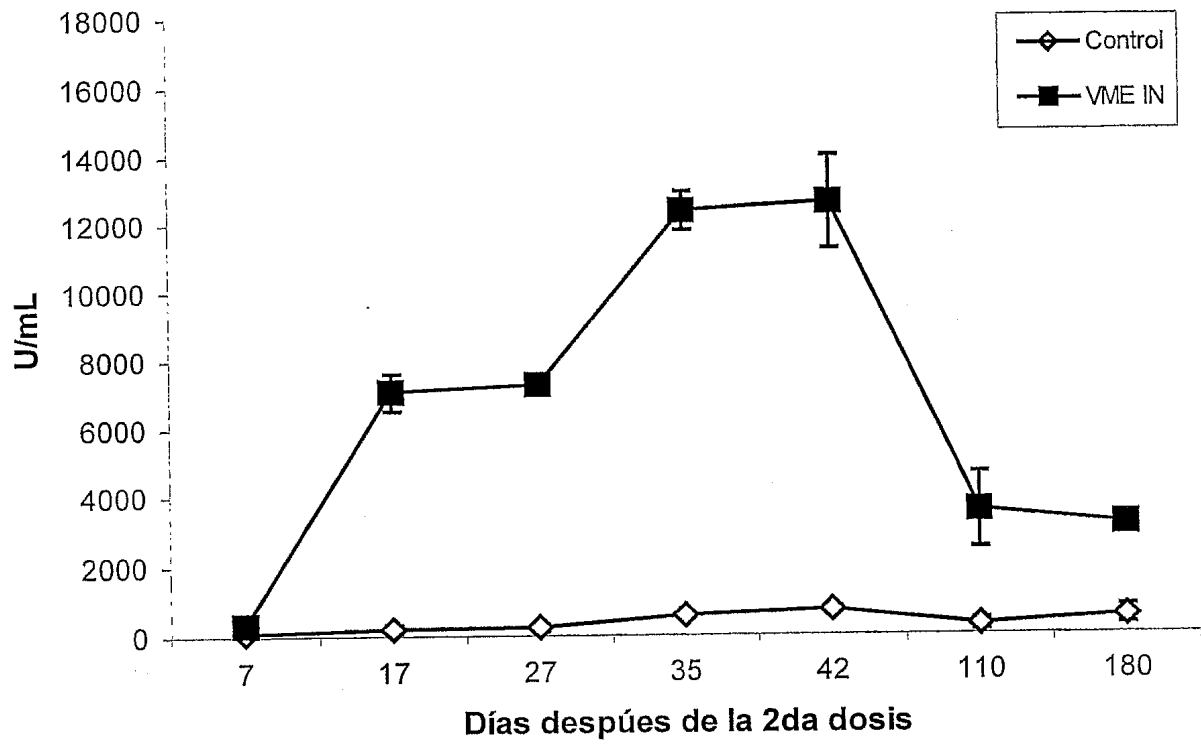


Fig. 9.

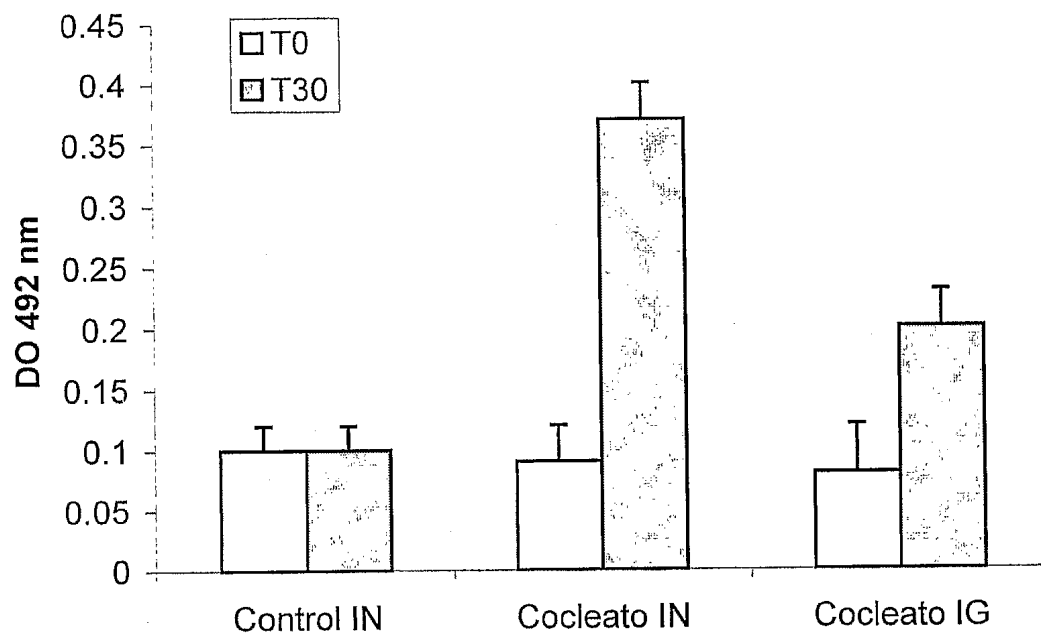


Fig. 10.

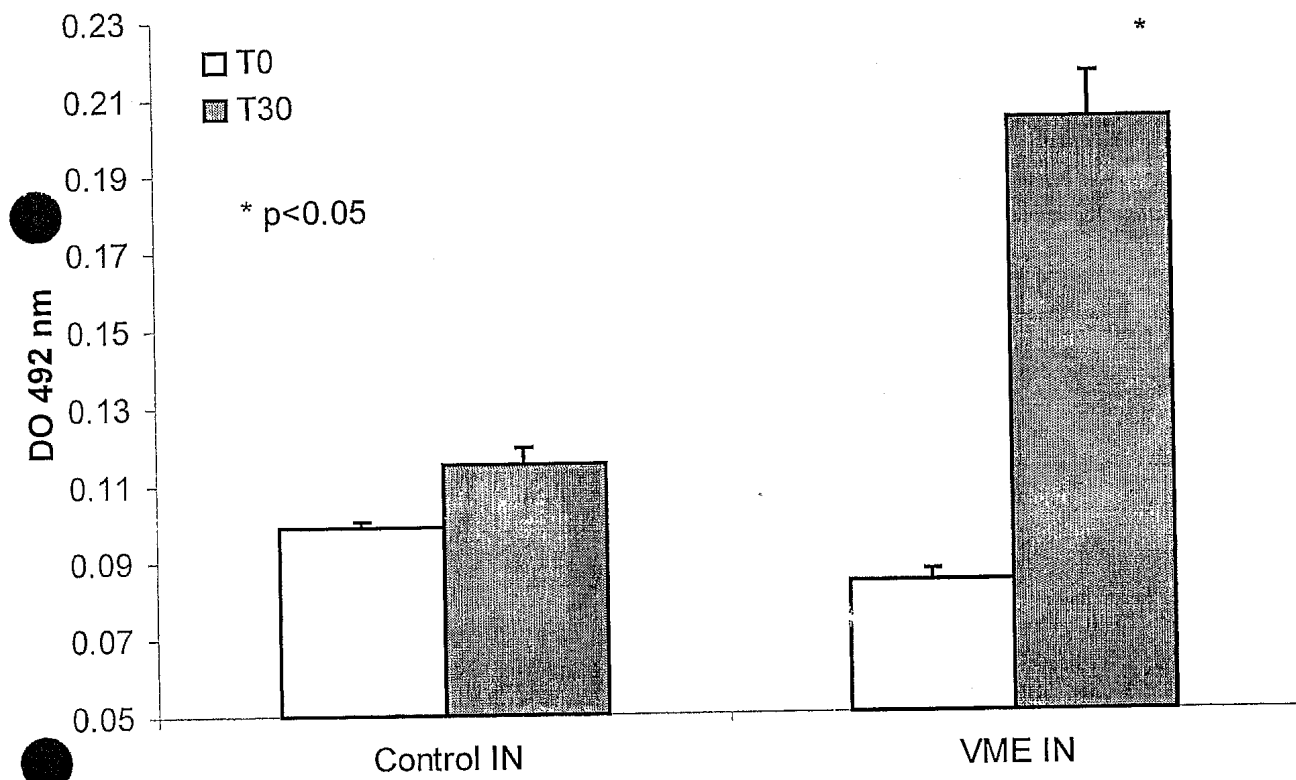


Fig. 11.

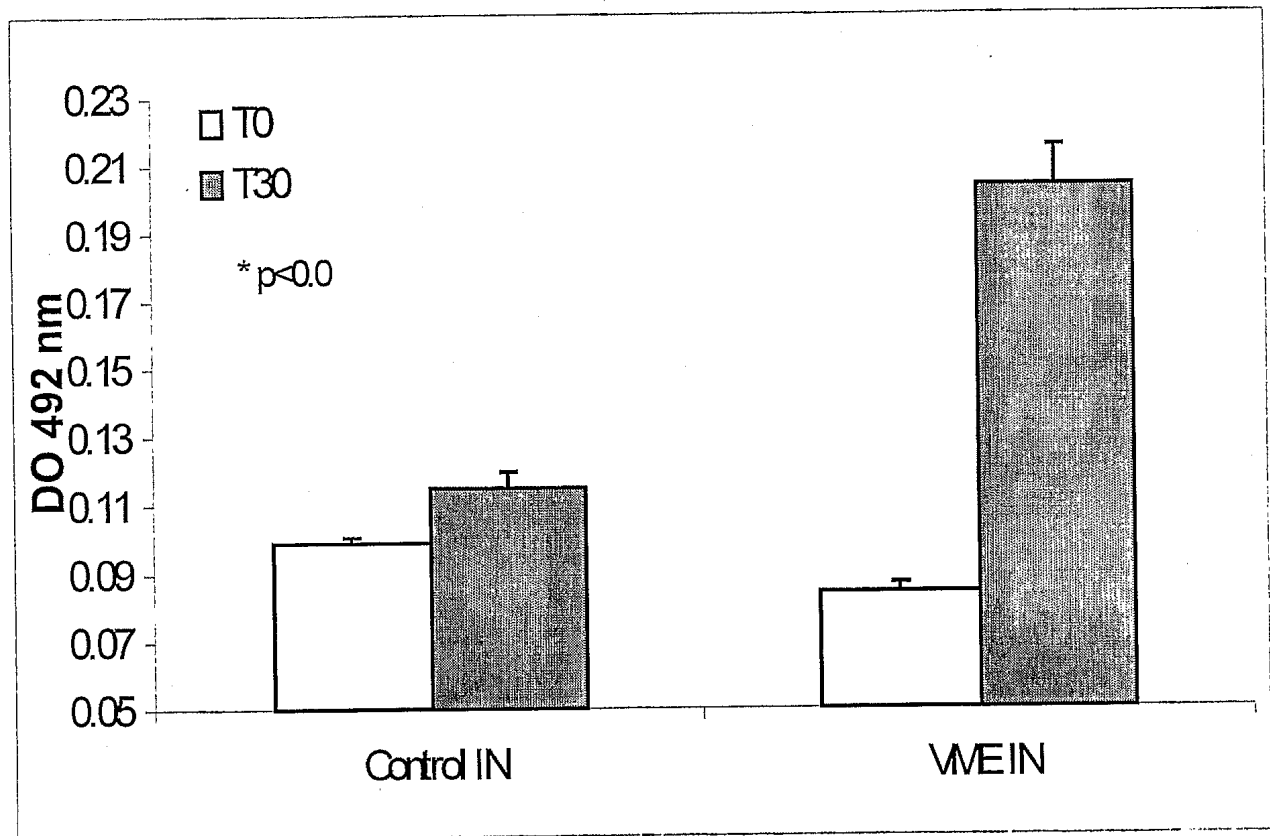


Fig. 12.

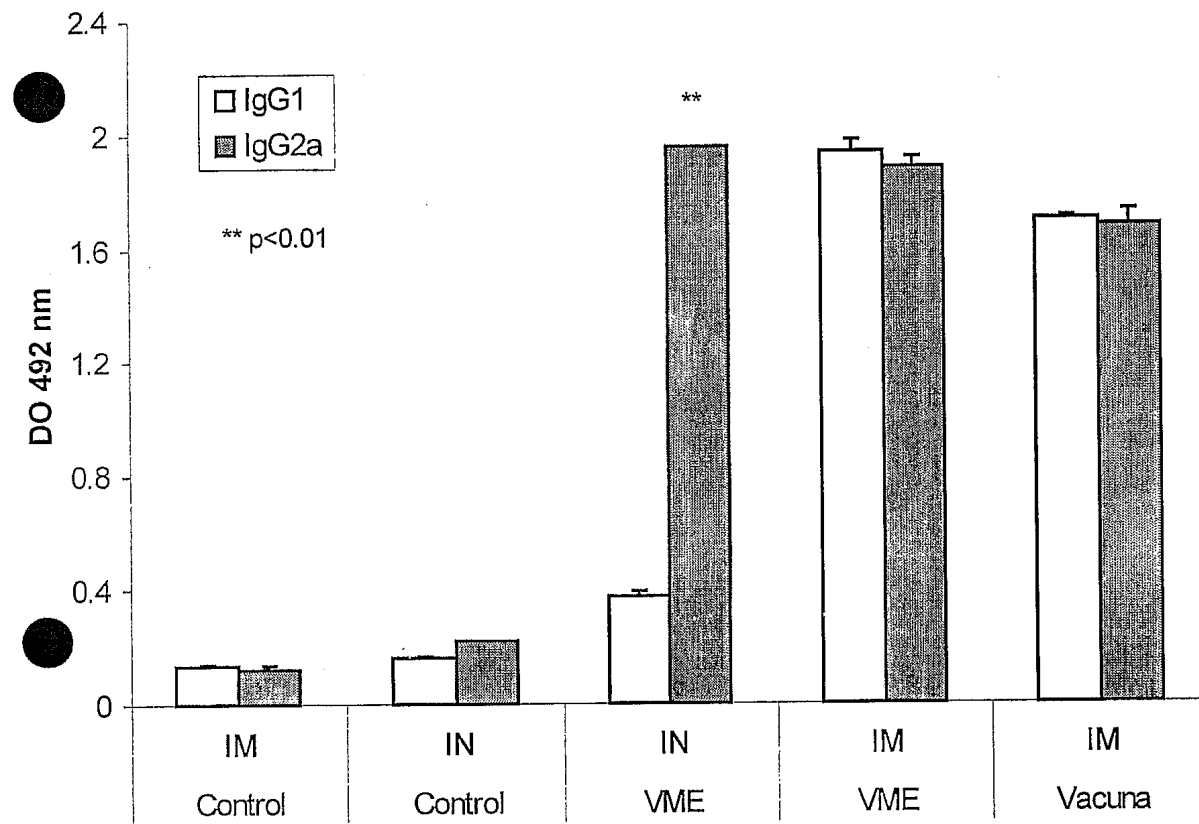


Fig. 13.

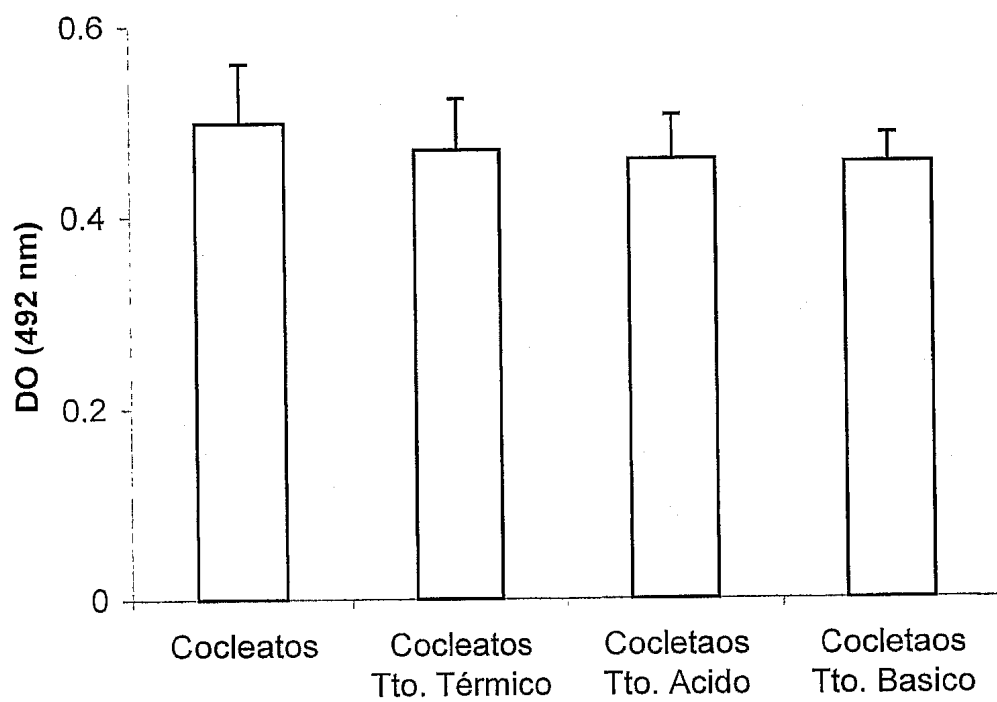




Fig. 14.

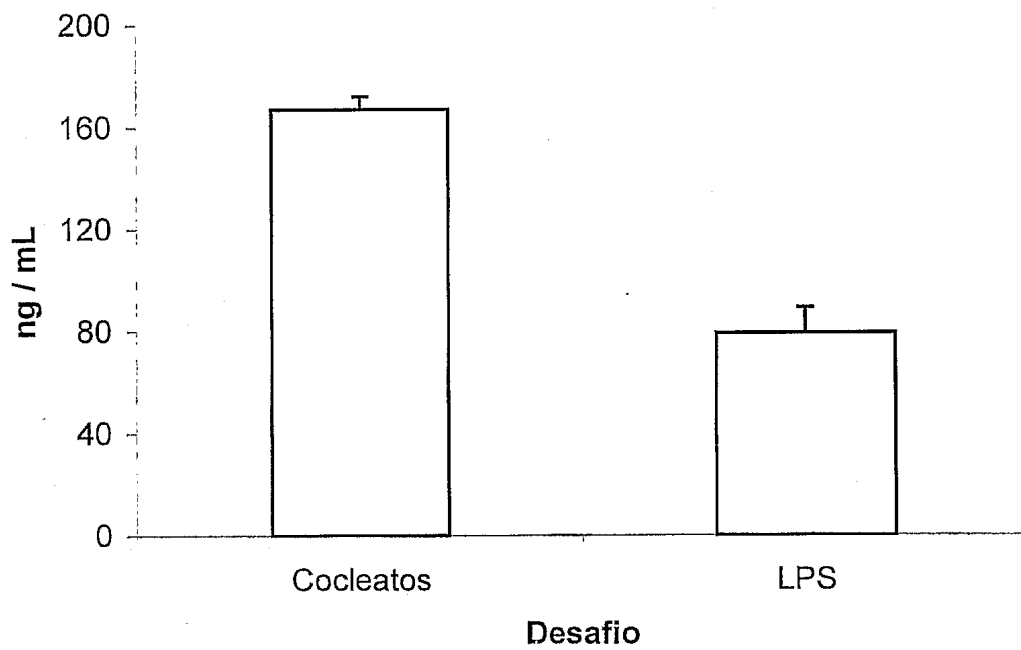


Fig. 15.

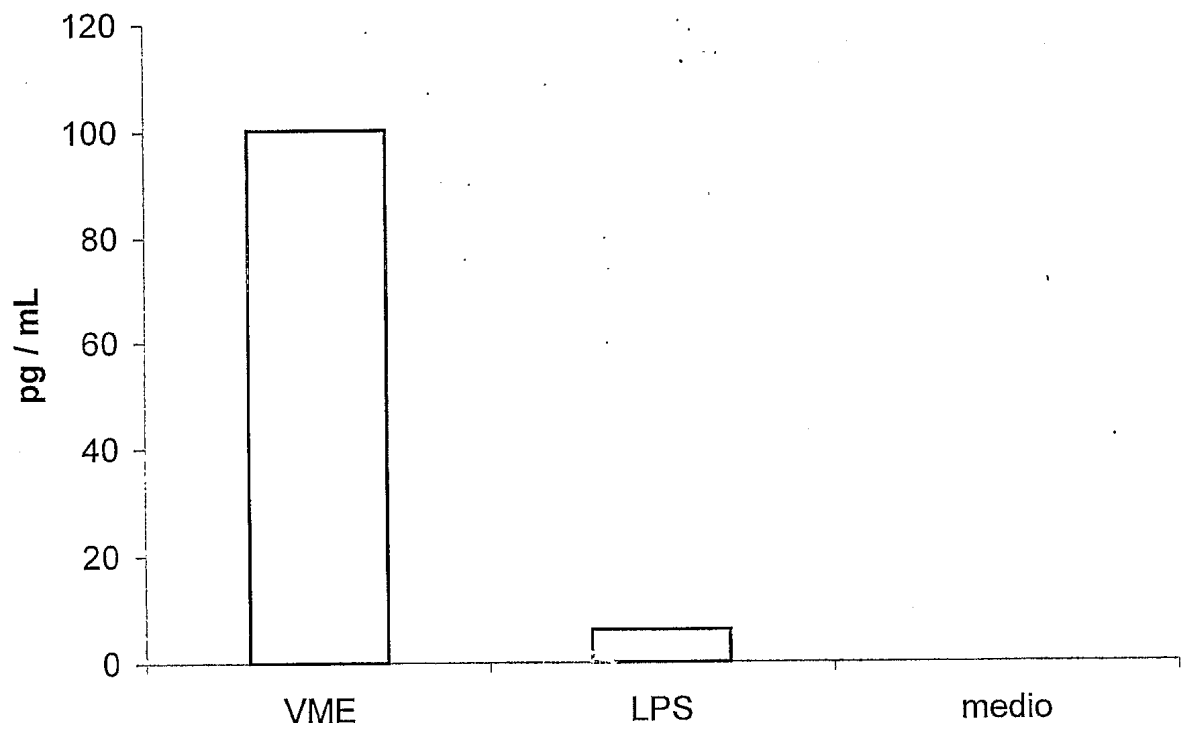


Fig. 16.

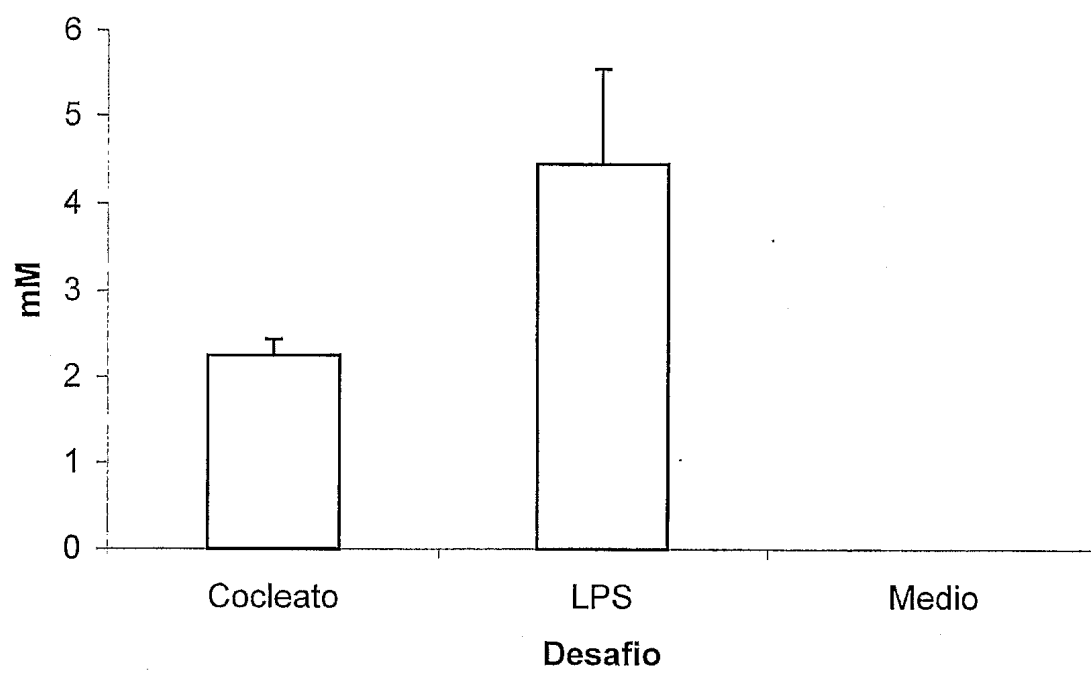


Fig. 17.

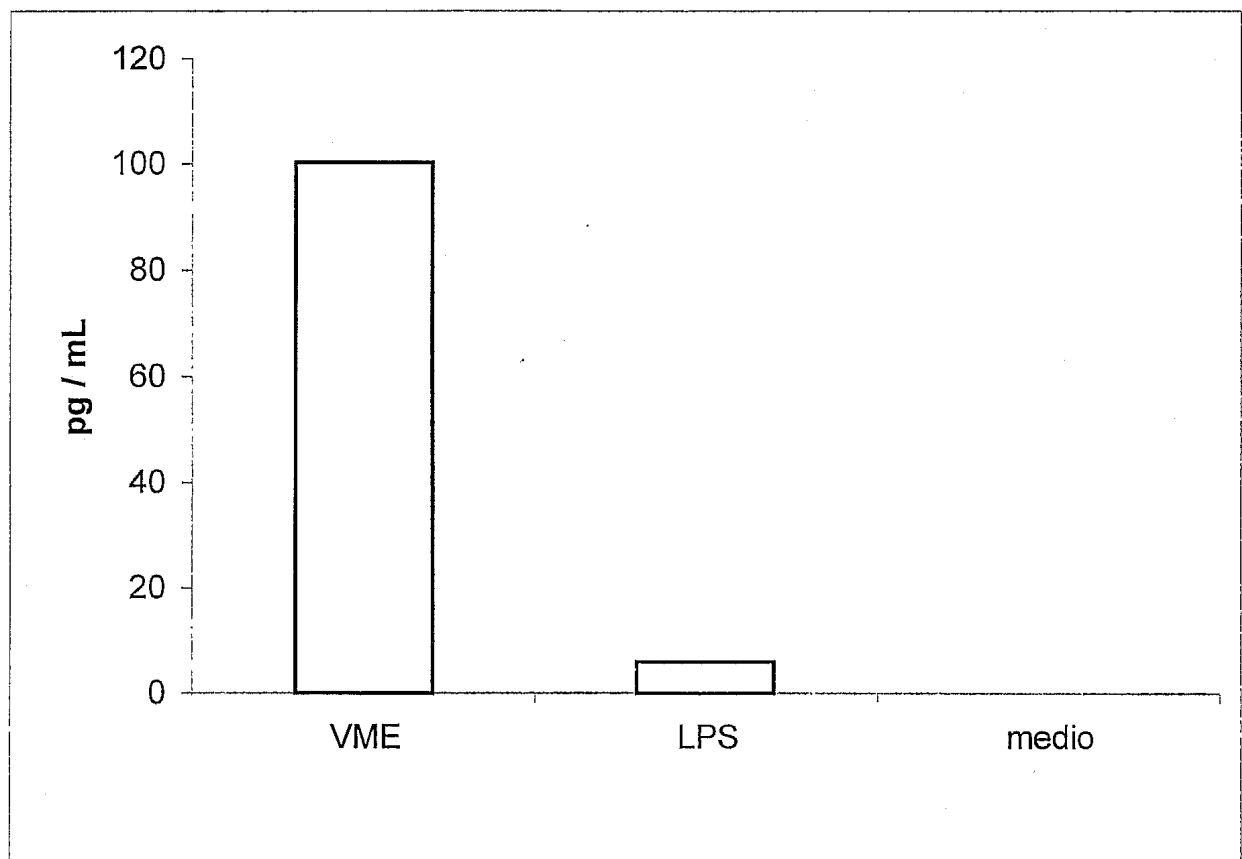


Fig. 18.

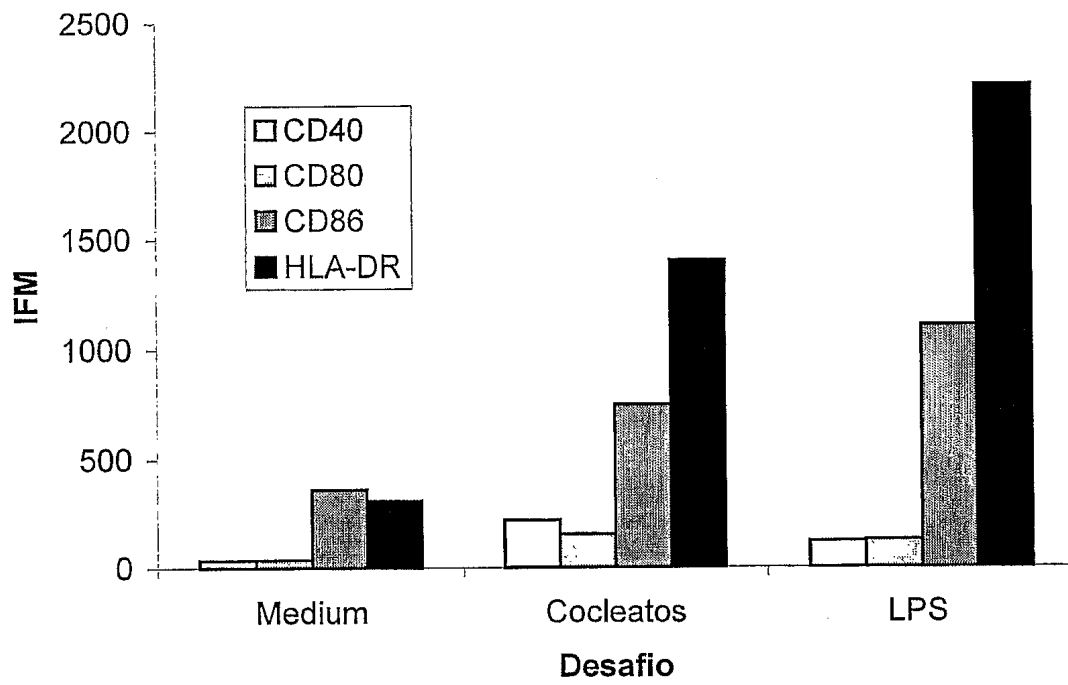


Fig. 19.

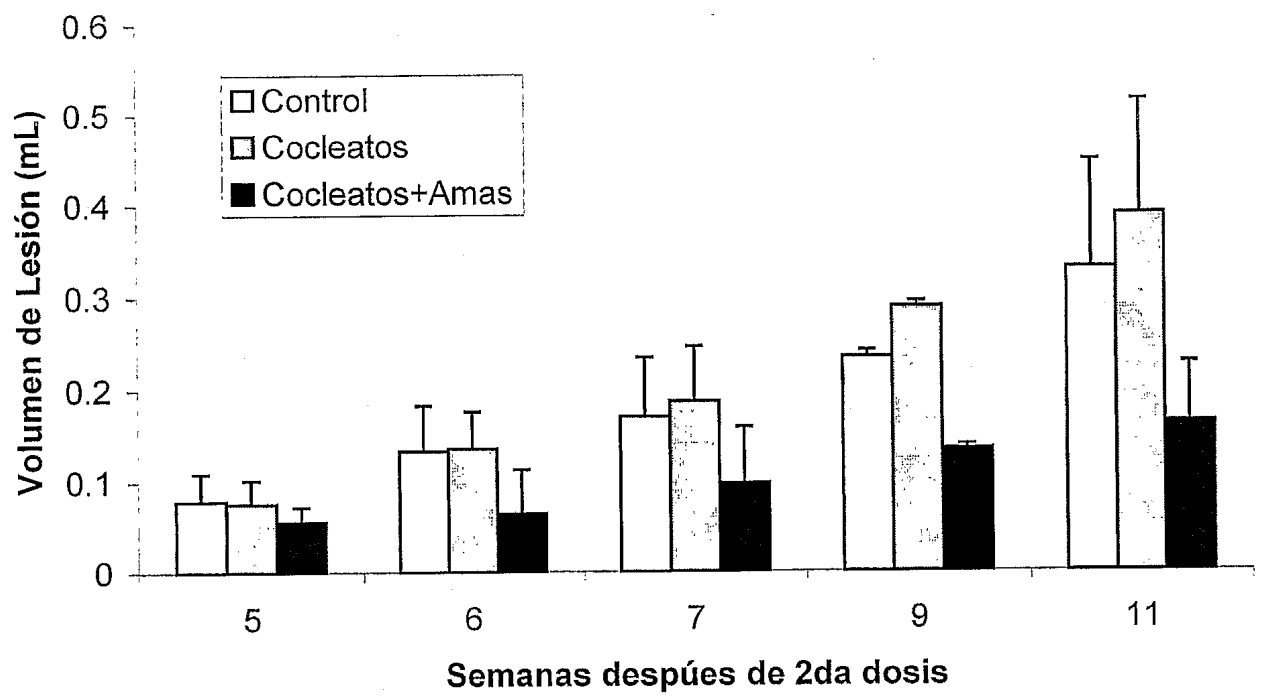


Fig. 20

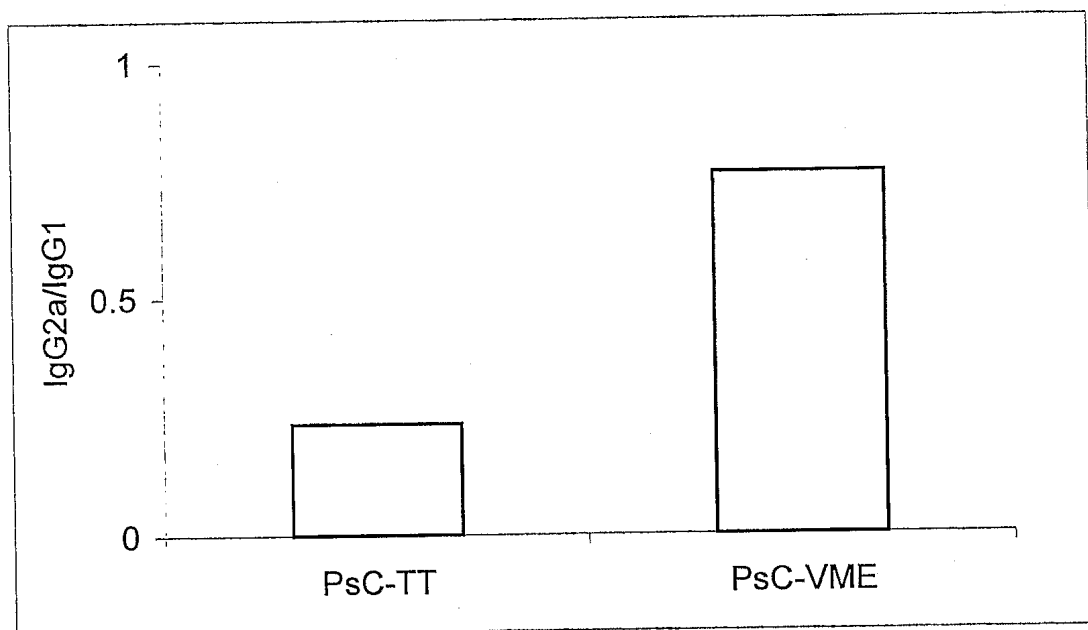


Fig. 21

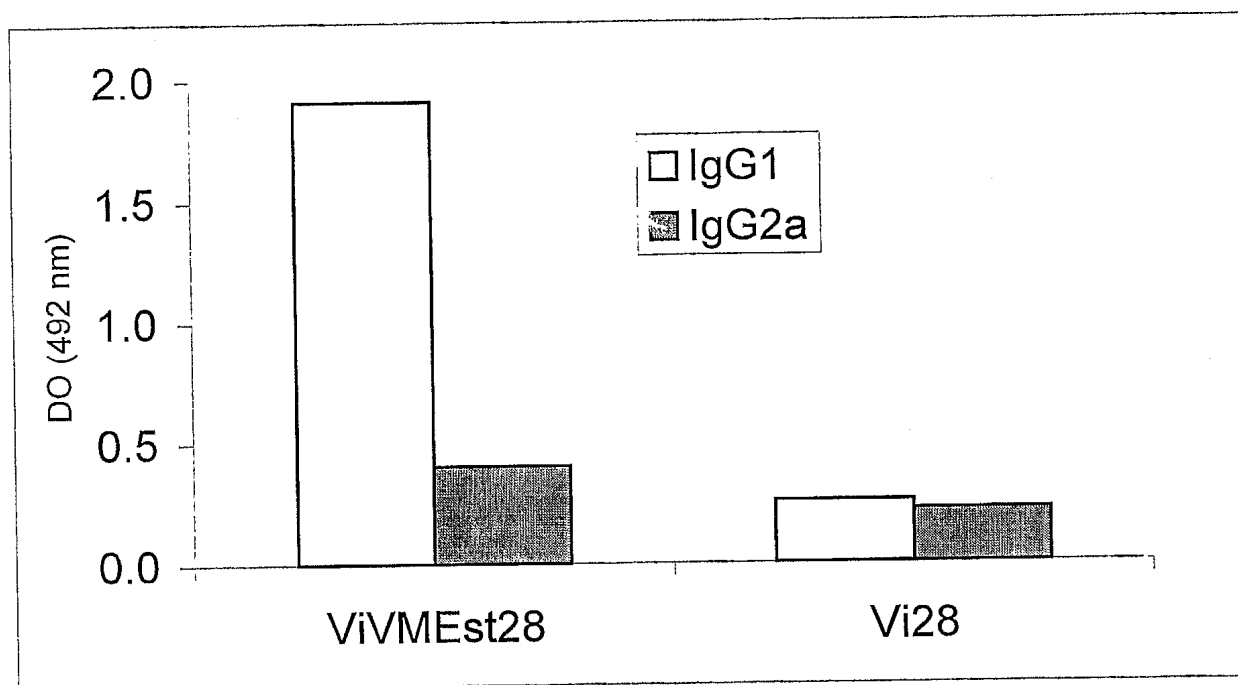




Fig. 22.

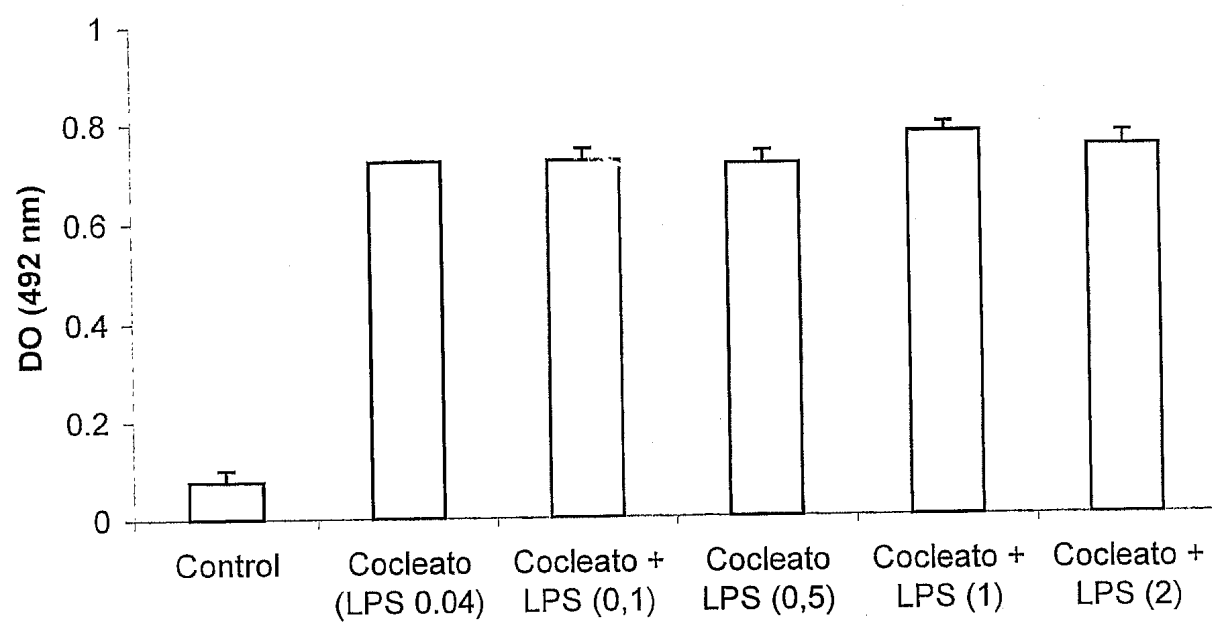


Fig. 23

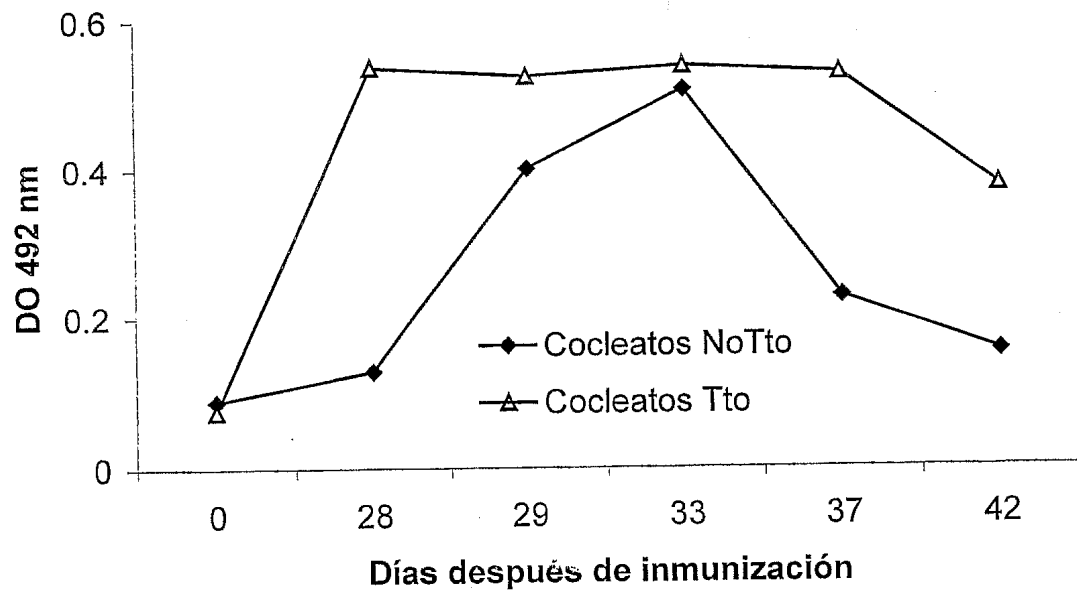


Fig. 24

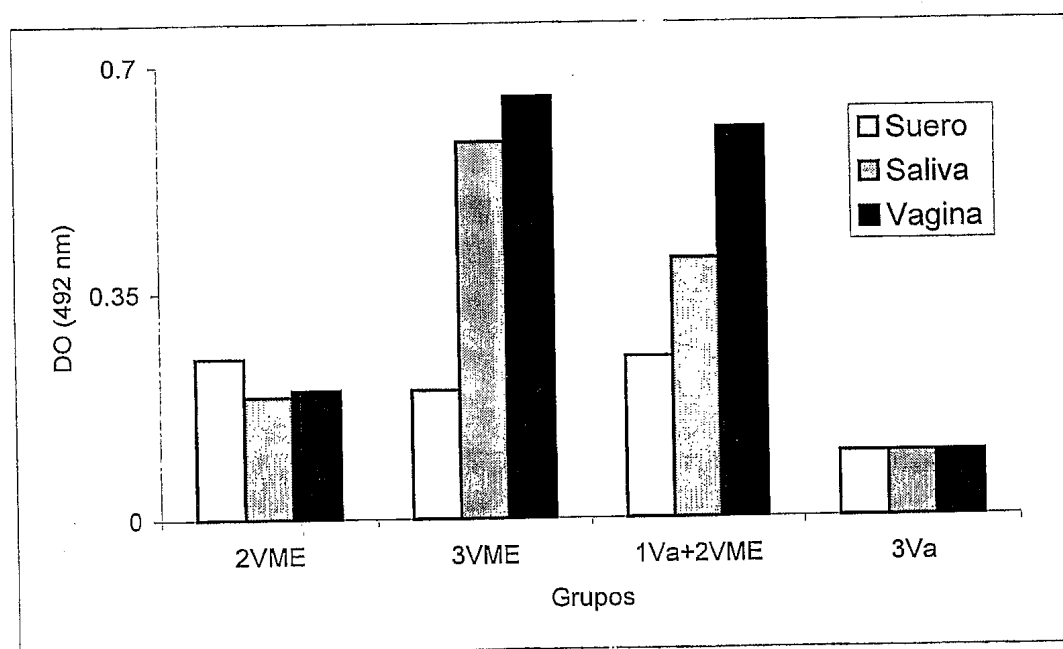


Fig. 25

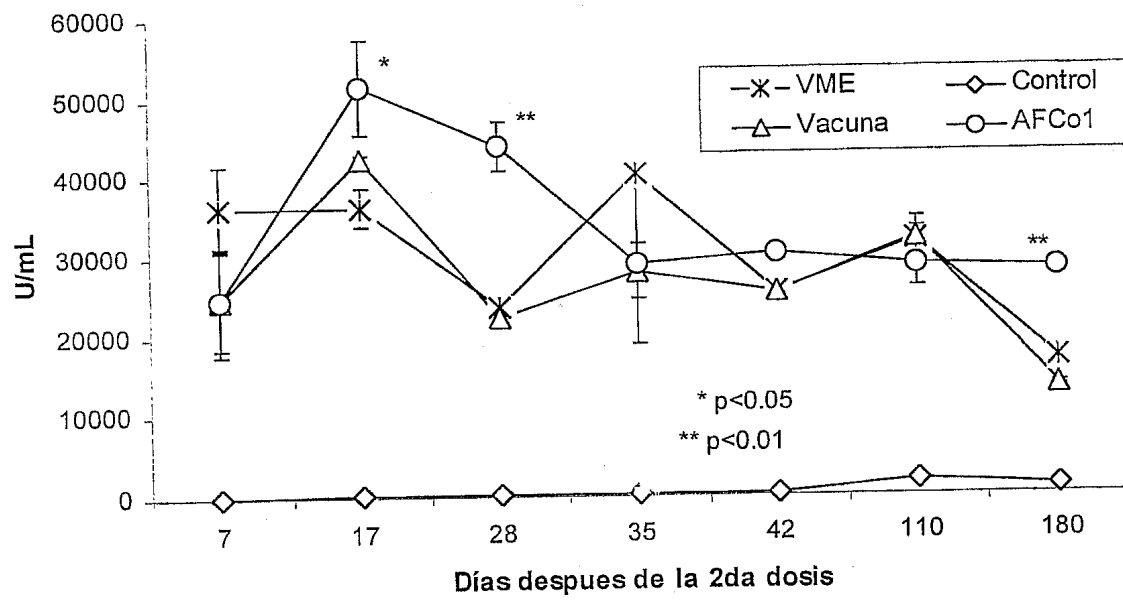


Fig. 26.

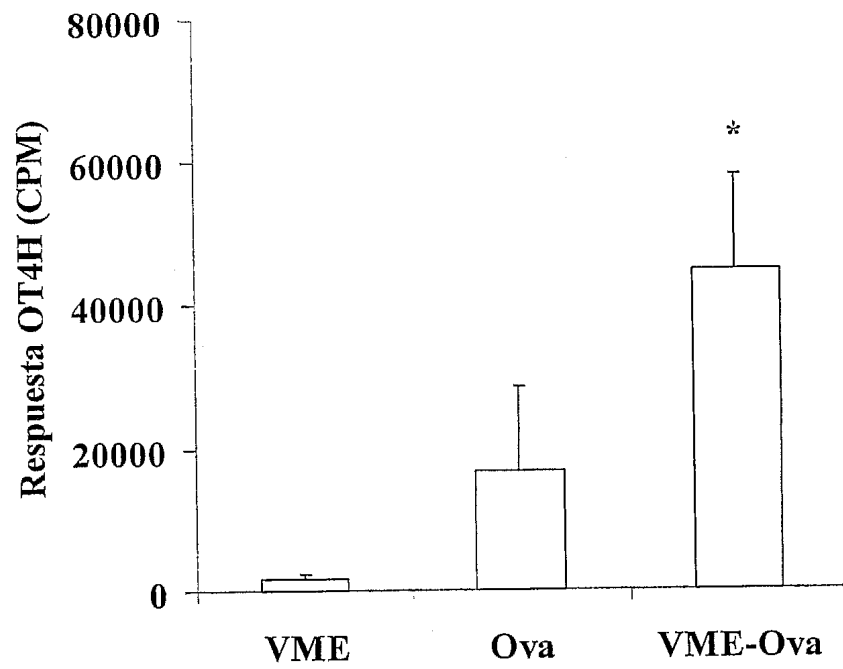


Fig. 27

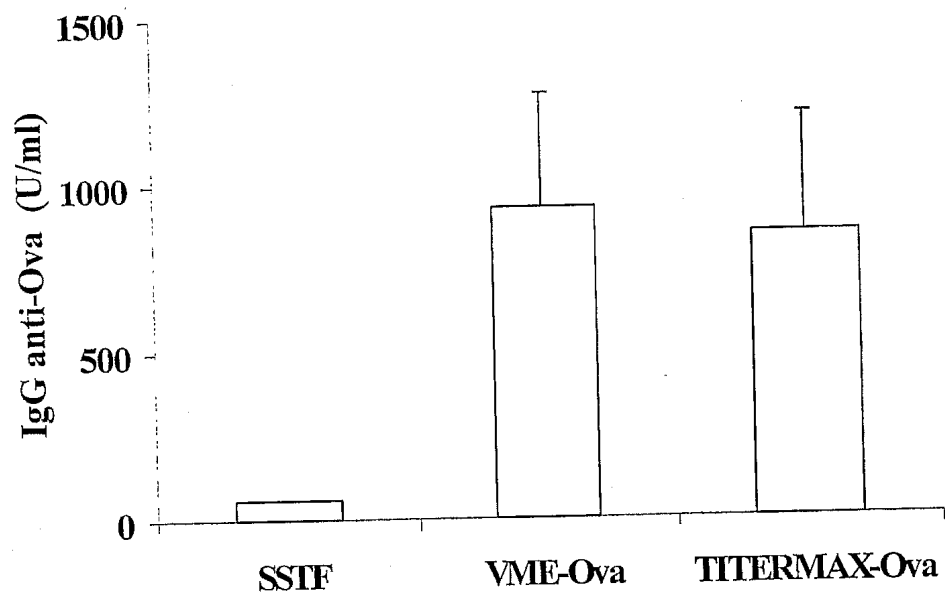


Fig. 28

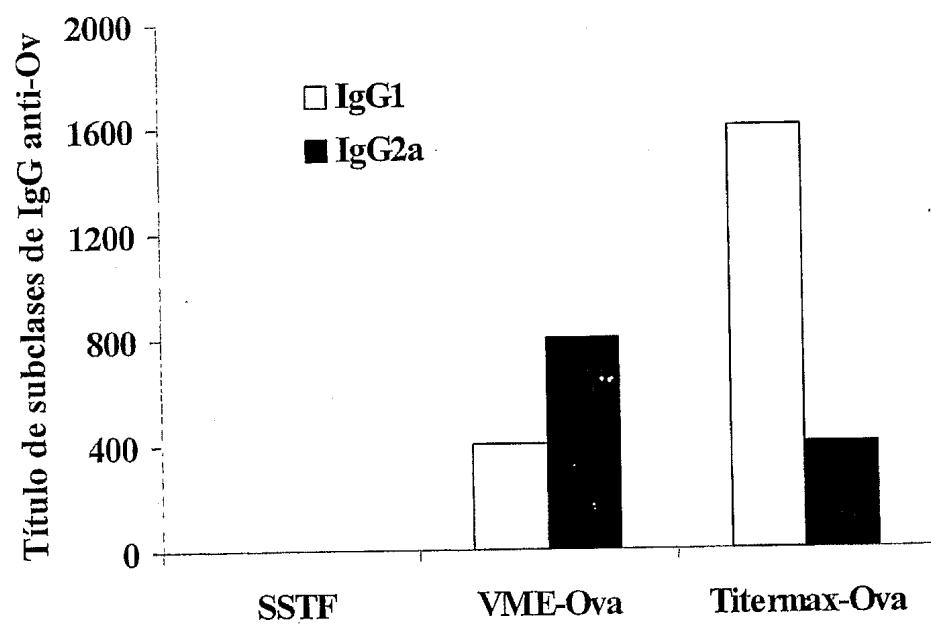


Fig. 29

